

# 分子標的抗がん薬の血中濃度情報を活用した腎癌治療の個別最適化に関する研究

著者	高崎 新也
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301乙第9416号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00133037">http://hdl.handle.net/10097/00133037</a>

博士論文

分子標的抗がん薬の血中濃度情報を活用した  
腎癌治療の個別最適化に関する研究

高崎 新也

本学位論文は、以下の原著論文を基に作成した。

1. **Shinya Takasaki**, Masaki Tanaka, Masafumi Kikuchi, Masamitsu Maekawa, Yoshihide Kawasaki, Akihiro Ito, Yoichi Arai, Hiroaki Yamaguchi, Nariyasu Mano.  
  
Simultaneous analysis of oral anticancer drugs for renal cell carcinoma in human plasma using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry.  
  
*Biomedical Chromatography*. 2018;32(6):e4184.
  
2. **Shinya Takasaki**, Yoshihide Kawasaki, Masafumi Kikuchi, Masaki Tanaka, Masato Suzuka, Aoi Noda, Yuji Sato, Shinichi Yamashita, Koji Mitsuzuka, Hideo Saito, Akihiro Ito, Hiroaki Yamaguchi, Yoichi Arai, Nariyasu Mano.  
  
Relationships between sunitinib plasma concentration and clinical outcomes in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma.  
  
*International Journal of Clinical Oncology*. 2018;23(5):936-943.
  
3. **Shinya Takasaki**, Hiroaki Yamaguchi, Yoshihide Kawasaki, Masafumi Kikuchi, Masaki Tanaka, Akihiro Ito, Nariyasu Mano.  
  
Long-term relationship between everolimus blood concentration and clinical outcomes in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma: a prospective study.  
  
*Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*. 2019;5:6.

## 目次

序論	1
第1章 チロシンキナーゼ阻害薬	6
第1節 序	6
第2節 血中濃度測定法	8
第3節 症例	17
第4節 血中スニチニブ濃度と臨床効果との関連性評価	23
第1項 方法	23
第2項 結果	25
第5節 考察	35
第2章 哺乳類ラパマイシン標的タンパク質阻害薬	38
第1節 序	38
第2節 血中濃度測定法	40
第3節 症例	41
第4節 血中エベロリムス濃度と臨床効果との関連性評価	44
第1項 方法	44
第2項 結果	46
第5節 考察	53
結論	55
実験の部	57
引用文献	67
謝辞	78

## 略号表

ALP: alkaline phosphatase

ALT: alanine aminotransferase

AST: aspartate aminotransferase

AUC: area under the blood concentration-time curve

BMI: body mass index

BSA: body surface area

C/D: concentration-to-dose

CID: collision-induced dissociation

CS: calibration standard

CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events

CYP: cytochrome P450

eGFR: estimated glomerular filtration rate

FGFR: fibroblast growth factor receptor

FLT-3: FMS-like tyrosine kinase-3 receptor

$\gamma$ -GTP:  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase

IS: internal standard

KIT: stem cell growth factor receptor

LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LLOQ: lower limit of quantification

mRCC: metastatic renal cell carcinoma

mTORi: mammalian target of rapamycin inhibitor

OS: overall survival

PDGFR: platelet-derived growth factor receptor

PFS: progression free survival

PK/PD: pharmacokinetics/pharmacodynamics

PS: performance status

PT-INR: prothrombin time-international normalized ratio

QC: quality control

Raf: raf kinase

RET: glial cell-line derived neurotrophic factor receptor

RCC: renal cell carcinoma

TDM: therapeutic drug monitoring

TKI: tyrosine kinase inhibitor

TTF: time to treatment failure

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

## 序論

腎癌の 90%は腎細胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) であり、わが国では 1 年間で人口 10 万人あたり男性 5.6 人、女性 4.1 人が発症すると言われている。そのうち、淡明細胞型が 8 割を占め、他に乳頭状、嫌色素性、転座型、集合管癌などがある[1-3]。RCC の危険因子として喫煙と肥満があり、遺伝子性の RCC には Von Hippel-Lindau 病が知られている[1-3]。初期の腎癌は痛みを伴わないために発見しにくく、他の病気の検査で偶然見つかったり、健康診断や人間ドックで見つかることが多い。腎癌には確立されたバイオマーカーが存在しないため、診断は専ら CT 検査、超音波検査、MRI 検査等の画像所見に依存しており、画像検査で診断できない場合は生検を行うこともある[2]。

RCC の標準治療は手術療法であるが、根治切除不能または転移のある場合は薬物療法や放射線療法が選択される[1-3]。薬物療法としては、従来からサイトカイン療法が用いられてきたが、現在では分子標的薬及び免疫チェックポイント阻害薬がよく用いられる[1-4]。現在使用できる分子標的薬としては、腫瘍の分化増殖におけるシグナル伝達経路の阻害や血管新生抑制作用を持つチロシンキナーゼ阻害薬 (tyrosine kinase inhibitor, TKI)、及び哺乳動物ラパマイシン標的阻害薬 (mammalian target of rapamycin inhibitor, mTORi) があり、2 次治療、3 次治療でも使われる[1-4]。これらの分子標的抗がん薬を用いた薬物治療を難しくする原因の一つに、薬物動態の個

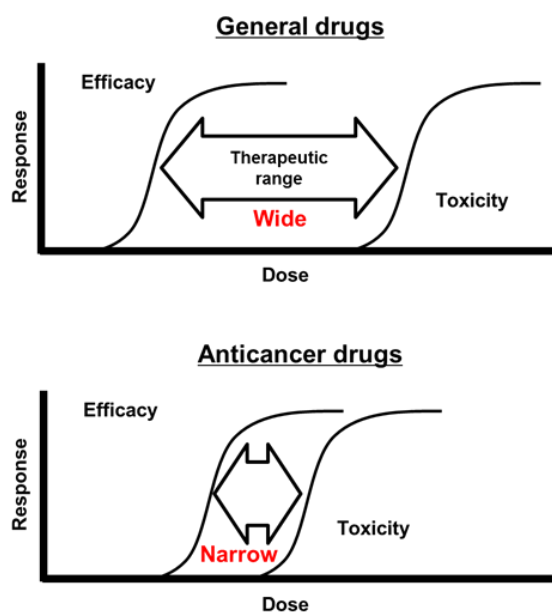


Figure 1. Therapeutic range in anticancer drugs

体内及び個体間変動があり、それらが有害事象や抗腫瘍効果に強く影響するものと考えられている[5]。当初は、殺細胞性抗がん薬よりも有害事象の発生頻度は少ないと期待されていたものの、実際には重篤な有害事象が原因で治療継続が困難となることも多い[4]。もともとがんの治療薬は、他の疾患を対象とした治療薬に比べて治療域と中毒域の差が大きい（Figure 1）、分子標的抗がん薬を用いる場合も精密に用量調節し、有害事象をきめ細やかに管理しつつ、治療効果を最大限に引き出すことが重要である[3,4,6]。こうした観点から、分子標的抗がん薬を用いるがん薬物療法において、pharmacokinetics/pharmacodynamics（PK/PD）解析結果に基づき、患者個別に用法用量を設定する治療薬物モニタリング（therapeutic drug monitoring, TDM）による治療管理に関する研究が進められている[5,7]。例えば、Bcr-Abl チロシンキナーゼ活性を選択的に阻害し、慢性骨髄性白血病、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病や消化管間質腫瘍に対する治療薬として使用されるイマチニブでは、これまでに多くの PK/PD に関する臨床データが蓄積されており[5,8-11]、本邦では 2012 年よりイマチニブの TDM に基づく薬物治療管理に特定薬剤治療管理料 1 の算定が認められている。先にも述べたように、腎癌の薬物療法には TKI や mTORi が使用されているが、治療効果や有害事象と用法用量の関係は十分に調べられているとは言えない。

現在、本邦で腎癌の治療に使用可能な分子標的薬には、ソラフェニブ、スニチニブ、アキシチニブ及びパゾパニブの 4 種の TKI と、エベロリムス及びテムシロリムスの 2 種の mTORi がある。これらの特徴を Tabel 1 にまとめた[12-17]。



**Tabel 1. Molecular targeted drugs used for kidney cancer in Japan**

Drug	Target molecule	Dosage	Major adverse event
Sorafenib <sup>12</sup>	Raf	400 mg twice daily Oral administration	Diarrhea (43%)
	VEGFR-1,2 PDGFR- $\beta$ KIT FLT-3		Rash or desquamation (40%) Fatigue (37%) Hand-foot skin reaction (30%) Alopecia (27%)
Sunitinib <sup>13</sup>	VEGFR-1, 2, 3	50 mg once daily Oral administration	Leukopenia (78%)
	PDGFR- $\alpha$ , $\beta$ KIT RET FLT-3		Neutropenia (72%) Anemia (71%) Increased creatinine (66%) Thrombocytopenia (65%)
Axitinib <sup>14</sup>	VEGFR-1, 2, 3	5 mg twice daily Oral administration	Diarrhoea (55%) Increased creatinine (55%) Hypertension (40%) Fatigue (39%) Hypocalcaemia (39%)
			Increased AST (61%) Increased ALT (60%) Fatigue (55%) Leukopenia (43%) Thrombocytopenia (41%)
Pazopanib <sup>15</sup>	VEGFR-1, 2, 3	800 mg once daily Oral administration	Anaemia (91%)
	PDGFR- $\alpha$ , $\beta$ KIT FGFR-1,3		Hypercholesterolaemia (76%) Hypertriglyceridaemia (71%) Hyperglycaemia (50%) Increased creatinine (46%)
Everolimus <sup>16</sup>	mTOR	10 mg once daily Oral administration	Asthenia (25%)
			Rash (23%) Anemia (22%) Nausea (18%) Anorexia (15%)
Temsirrolimus <sup>17</sup>	mTOR	25 mg once a week Intravenous administration	

12. B. Escudier, et al. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(2):125-134.  
13. R. J. Motzer, et al. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(2):115-124.  
14. B. I. Rini, et al. *Lancet*. 2011;378(9807):1931-1939.  
15. R. J. Motzer, et al. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(8):722-731.  
16. R. J. Motzer, et al. *Lancet*. 2008;372(9637):449-456.  
17. G. Hudes et al. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(22):2271-2281.

スニチニブ以外の経口剤は連日投与だが、スニチニブは標的分子が多岐に渡り有害事象が多いことから、投与方法は4週投与2週休薬である[18]。また、最近では、有害事象が少なく、効果が同等であるとの理由から、2週投与1週休薬の投与方法も行われる[4,19-22]。しかしながら、薬物代謝酵素等に関わる相互作用が顕著に現れることもあり[23]、画一的な用法用量では、必ずしも各患者に適した薬物療法を提案できているとは言い難い。

そこで、今回、腎癌に対する分子標的抗がん薬治療において、TDMを用いて有害事象をより厳格に管理し、その治療効果を最大限に引き出すことを目的とし、分子標的抗がん薬の血中濃度情報をもとに、効果や有害事象との関連を精査した。本邦では、腎癌治療において、先に述べた分子標的抗がん薬を順次使用する逐次治療が行われる[2,4]。第1章ではTKIを、第2章では経口mTORiであるエベロリムスについて、薬物血中濃度と有害事象及び治療効果との関連を精査することとした。

第1章において、まず、TKIの一斉測定法の構築を試みた。これまでTKIは薬物毎に血中濃度を測定していたが、測定準備に要する時間が長く、日常診療におけるルーチン測定には不向きであったことから、液体クロマトグラフィー／質量分析法（liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS）を用いて測定対象のすべてのTKIを同一の方法で測定可能な分析法を構築した。続いて、スニチニブ及びパゾパニブで腎癌治療を行った症例を用いて、血中濃度情報の有用性を評価した。さらに、TKIで最も使用頻度の高いスニチニブの血中濃度と効果及び有害事象との関連を調査した。スニチニブは、初回コースにおける血中薬物濃度情報を利用したPK/PD解析結果から[18,24]、2018年に保険診療における特定薬剤治療管理料1が認められている。スニチニブは有害事象の影響で用量調節されることが多く、しかもチトクロームP450（cytochrome P450, CYP）3A4で代謝され

る[25,26]ことから血中薬物濃度の個体内変動も予想されるが、これまで長期的に血中濃度をフォローした報告は少ない。従って、スニチニブの血中濃度と臨床効果との関連性を正確に評価するには、長期的に血中濃度をモニタリングし精査することが重要となる。一方、第2章では、経口 mTORi であるエベロリムスについて、症例の評価と PK/PD 解析を行った。エベロリムスについてもスニチニブと同様に、長期的に血中薬物濃度をモニタリングした報告はない。個体内変動の確認や、血中薬物濃度と有効性について精査するには、定期的に血中薬物濃度をモニタリングする必要がある。そこで、腎癌に対する分子標的抗がん薬であるスニチニブ及びエベロリムスの血中薬物濃度情報をもとに PK/PD 解析を行い、個別化医療への応用を試みることにした。

## 第1章 チロシンキナーゼ阻害薬

### 第1節 序

腎癌では、TKI を主として用いる薬物療法が行われ、本邦ではソラフェニブ、スニチニブ、アキシチニブ及びパゾパニブが使用される[2,4]。これら TKI は、血管内皮増殖因子受容体（vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR）や血小板由来増殖因子受容体（platelet-derived growth factor receptor, PDGFR）などのチロシンキナーゼ活性を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する[3,4]。有害事象としては、手足症候群、高血圧、下痢、脱毛、疲労、甲状腺機能低下症などがあり、時に重篤な肝機能障害、出血、骨髄抑制などが起こり治療中断に至る[4,12-15]。これまでも PK/PD 解析に関する報告があり[5,7]、日本人患者における研究も進められている[24,27-29]。

東北大学病院（以下、当院）においても、がん化学療法の個別化医療を目的に、これまで分子標的抗がん薬の血中濃度測定を行ってきた。2011 年～2018 年に当院泌尿器科において、腎癌治療目的でソラフェニブ、スニチニブ、アキシチニブあるいはパゾパニブを使用し、血中濃度測定を行った患者はのべ 99 人であった。それらの患者検体を薬物毎に測定するには多くの労力が必要であった。そこで、まず、これら TKI の一斉測定法を構築することとした。次に、スニチニブ及びパゾパニブの血中濃度測定を行った患者を用いて、血中濃度情報の有用性を評価した。

PK/PD 解析は、最も使用患者の多かったスニチニブについて行った。メタアナリシス解析によると、スニチニブの血中濃度－時間曲線下面積（area under the blood concentration-time curve, AUC）の大きい患者群の方が生存期間及び無増悪期間が長く、腫瘍体積が大きく減少している[30]。VEGFR 及び PDGFR のリン酸化抑制に関する基礎実験の結果をもとに、スニ

チニブの抗腫瘍効果の発現には 50 ng/mL 以上の血中濃度が必要と推測されている[31]。一方、スニチニブは CYP3A4 の作用によって活性代謝物である *N*-デスエチルスニチニブに変換されるため[25,26]、未変化体及び活性代謝物の血中濃度の和（以下、総血中濃度）を PK パラメータとして PK/PD 解析が行われる[18,24,30,32,33]。スニチニブの総血中濃度が 100 ng/mL 以上になると用量制限毒性の発現率が上昇すると報告されており[18]、したがって腎癌治療目的にスニチニブを使用するときの有効血中濃度域は、50～100 ng/mL と推測される。AUC は日本人と日本人以外（オーストラリア、ブラジル、カナダ、ヨーロッパ、米国）の間に差が小さいものの、日本人の方が好中球減少症や血小板減少症などの重篤な血液毒性発現の頻度が高いことが知られている[34]。また、日本人において、多くの患者が投与量の減量を余儀なくされることや[35]、総血中濃度が 100 ng/mL 以上になると重篤な有害事象の発現頻度が上昇することが報告されている[24]。当然のことながらより強い抗腫瘍効果を得るには、十分な投与量が必要となることも知られている[36]。先行研究では初回コースにおける血中濃度を基に PK/PD 解析されているが[18,24]、薬効をより正確に評価するには、個々の患者に適した用量に調節した後の血中濃度についても調査する必要がある。そこで、日本人の腎癌患者における有効総血中スニチニブ濃度を探索することを目的に、血中濃度を追跡調査した。

## 第2節 血中濃度測定法

日常臨床における血中薬物濃度の測定では、患者検体を測定する前に検量線作成や品質管理 (quality control, QC) 試料の測定を毎日行う必要がある。よって、臨床では、高精度かつ、迅速性と簡便性を兼ね備えた分析法が求められる。これまでは薬物毎に測定を行うのが一般的であったが、最近では LC-MS/MS を用いた血中薬物濃度の一斉測定法の開発が進められている[37-40]。TKI の一斉測定法に関するいくつかの報告があるが[38-41]、本邦で腎癌に対して使用されるソラフェニブ、スニチニブ、アキシチニブ及びパゾパニブの一斉測定法の報告はない。また、ソラフェニブとスニチニブでは、代謝物であるソラフェニブ *N*-オキシドと *N*-デスエチルスニチニブが臨床効果に影響を及ぼすことが知られている[18,42]。そこで、LC-MS/MS を用いたこれら 4 薬物と 2 代謝物の計 6 化合物 (Figure 2) について、血中薬物濃度の一斉測定法開発を目指した。

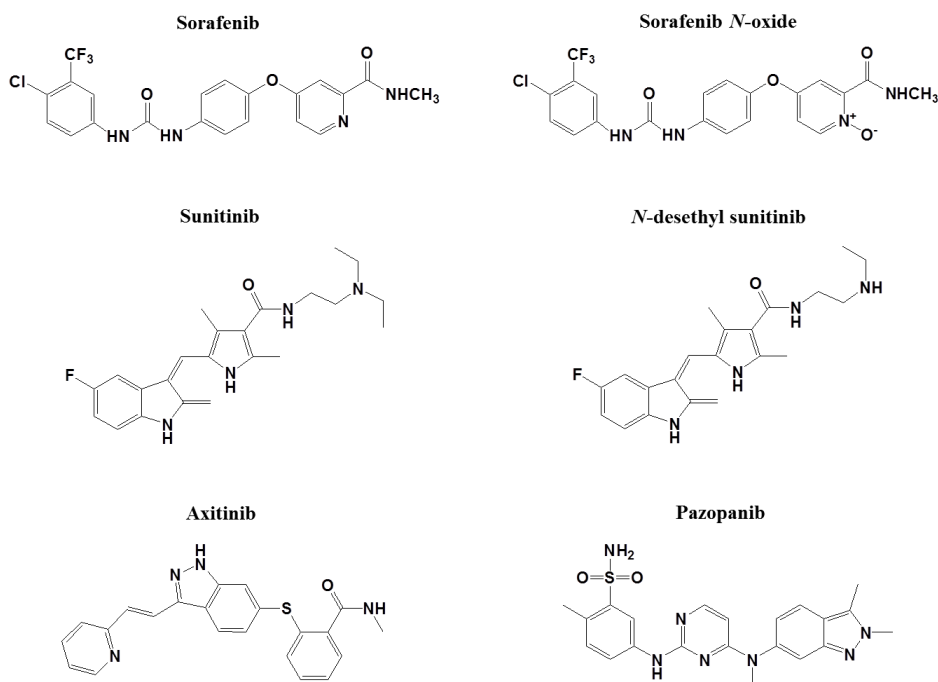


Figure 2. Chemical structures of TKIs and two metabolites

## 分析条件の検討

まず、MS 条件の最適化を行った。ESI プローブを装着した 3 連四重極型質量分析計 LCMS-8050 (Shimadzu, Kyoto, Japan) に、高速液体クロマトグラフとして Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) を接続した装置を使用した。いずれの化合物も高感度に検出可能な陽イオン検出モードを用い、内標準物質 (internal standard, IS) としてイマチニブ- $^2\text{H}_8$  を用いた。今回検討した全ての化合物で、1 価のプロトン付加分子に由来するピークがマススペクトル上最も強く認められた。次に、それらをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオン スキャン分析を行い、選択性が高く、また感度よく検出できるトランジションを選択し、各種パラメータを最適化した (Table 2)。

次に、LC 条件を検討した。移動相には A 液としてアセトニトリル溶液を用い、B 液として 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液を用いた。試料注入後 0~0.25 分は A 液の比率を 30% に固定し、0.25~3.5 分の 3.25 分間で A 液比率を直線的に 30% から 90% に増大させ、さらに 3.5~4.5 分は A 液比率を 90% に固定した後、A 液比率を 30% に戻して 1.5 分間平衡化するグラジエントプログラムを用い、流速は 0.3 mL/min とした。分析カラムに Inertsil ODS-3 (100 mm×2.1 mm i.d., 2  $\mu\text{m}$ , GL Sciences, Tokyo, Japan) を用い、カラムオーブンを 40°C に設定した。この条件で各化合物を分析したところ、スニチニブと *N*-デスエチルスニチニブに相当するトランジションをモニターしたクロマトグラム上に二つのピークが認められたが (Figure 3)、合成標品中に含まれるトランス型異性体が検出されたものと考えられた[40,41]。また、化合物の溶出時間について、ソラフェニブは 4.2 分、ソラフェニブ *N*-オキシドは 3.7 分、スニチニブは 1.6 分 (*trans*-isomer) と 2.4 分 (*cis*-isomer)、*N*-デスエチルスニチニブは 1.3 分 (*trans*-isomer) と 2.2 分 (*cis*-isomer)、アキシチニブは 3.0 分、パゾパニブは 2.9 分、IS で

あるイマチニブ- $^2\text{H}_8$  は 2.2 分といずれの化合物も 5 分以内に分離できた (Figure 3)。

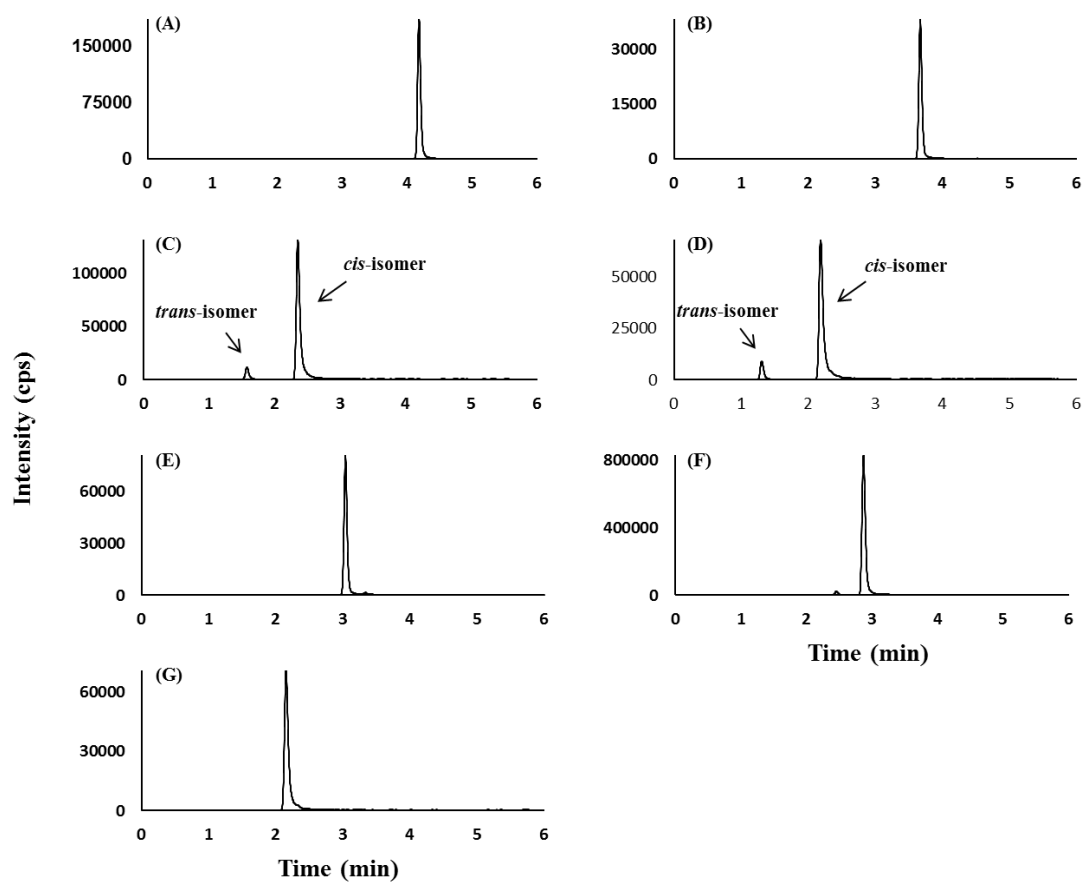
次に、前処理法を検討した。遮光チューブ中のヒト血漿サンプル 50  $\mu\text{L}$  に IS を 100 ng/mL 含むアセトニトリル溶液 50  $\mu\text{L}$  とアセトニトリル 400  $\mu\text{L}$  を添加し、5 分間攪拌した後に 15,000 $\times g$  で 5 分間遠心した。上清 50  $\mu\text{L}$  を 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 450  $\mu\text{L}$  にて希釈した後、2  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS へ注入した。

長期的に血中濃度を追跡調査するため、入院だけでなく外来においても可能な採血ポイントとして服用直前の濃度を測定することを目的に、各薬物に関するこれまでの報告 [18,24,27,28,42,43]を参考に定量範囲を設定した (Table 3)。また、スニチニブと *N*-デスエチルスニチニブは光により *Z* 体から *E* 体へとシス-トランス異性化反応が生じることが知られ [40,41]、血漿中では 15 分間の光暴露で 10%が *Z* 体から *E* 体へと変化し、その後はプラトーとなることが報告されている [44]。今回、スニチニブと *N*-デスエチルスニチニブは、*E* 体のピーク面積と *Z* 体のピーク面積の総和を用いて評価することとした。ヒトブランク血漿と各薬物の定量下限サンプル (lower limit of quantification, LLOQ) 及びヒトブランク血漿に IS を添加した試料を分析したときのクロマトグラムを比較したが、いずれのトランジションにおいても薬物のピーク付近にブランク血漿由来の夾雑ピークは認めらなかった。目的の定量範囲において、ソラフェニブ *N*-オキシド、スニチニブ、*N*-デスエチルスニチニブ及びアキシチニブは良好な直線性を示したものの、ソラフェニブとパゾパニブは高濃度領域で良好な直線が得られず (Figure 4)、直線範囲を広げる必要があった。



**Table 2. Specific mass spectrometer settings for each analyte**

Compound	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Desolvation bias (V)	Qarray bias (V)	Collision energy (V)	Retention time (min)
Sorafenib	465.1	406.0	0 (normal) 70 (in-source CID)	0 (normal) 24 (in-source CID)	29	4.2
Sorafenib <i>N</i> -oxide	481.1	286.1	0	0	25	3.7
Sunitinib	399.4	283.3	0	0	27	1.6 ( <i>trans</i> -isomer) 2.4 ( <i>cis</i> -isomer)
<i>N</i> -Desethyl sunitinib	371.4	283.3	0	0	24	1.3 ( <i>trans</i> -isomer) 2.2 ( <i>cis</i> -isomer)
Axitinib	387.1	356.1	0	0	22	3.0
Pazopanib	438.2	341.4	0 (normal) 20 (in-source CID)	0 (normal) 36 (in-source CID)	45	2.9
Imatinib- <sup>2</sup> H <sub>8</sub>	502.5	394.4	0	0	27	2.2



**Figure 3. Selected reaction monitoring chromatograms of calibration standard medium of (A) sorafenib, (B) sorafenib *N*-oxide, (C) sunitinib (*cis/trans*-isomers), (D) *N*-desethyl sunitinib (*cis/trans*-isomers), (E) axitinib, (F) pazopanib, and (G) imatinib- $2H_8$**

**Table 3. Concentration of TKIs and metabolites in the calibration standards and quality**

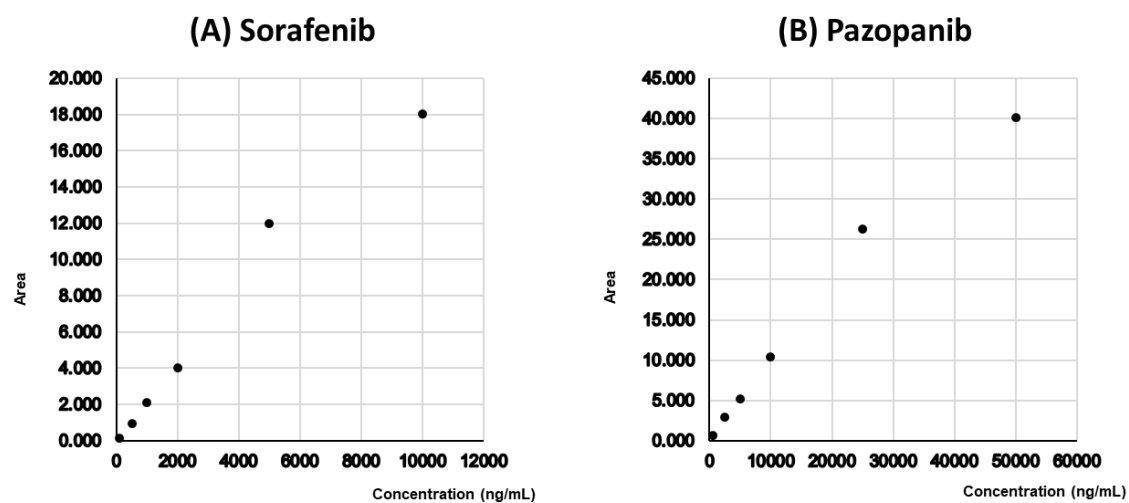
**controls**

Sample	Analyte (ng/mL)					
	Sorafenib	Sorafenib <i>N</i> -oxide	Sunitinib	<i>N</i> -Desethyl sunitinib	Axitinib	Pazopanib
CS1	100	10	1	1	1	500
CS2	500	50	5	5	5	2,500
CS3	1,000	100	10	10	10	5,000
CS4	2,000	200	20	20	20	10,000
CS5	5,000	500	50	50	50	25,000
CS6	10,000	1,000	100	100	100	50,000
QC LLOQ	100	10	1	1	1	500
QC low	200	20	2	2	2	1,000
QC medium	4,000	400	40	40	40	20,000
QC high	8,000	800	80	80	80	40,000

CS, calibration standard

QC, quality control

LLOQ, lower limit of quantification



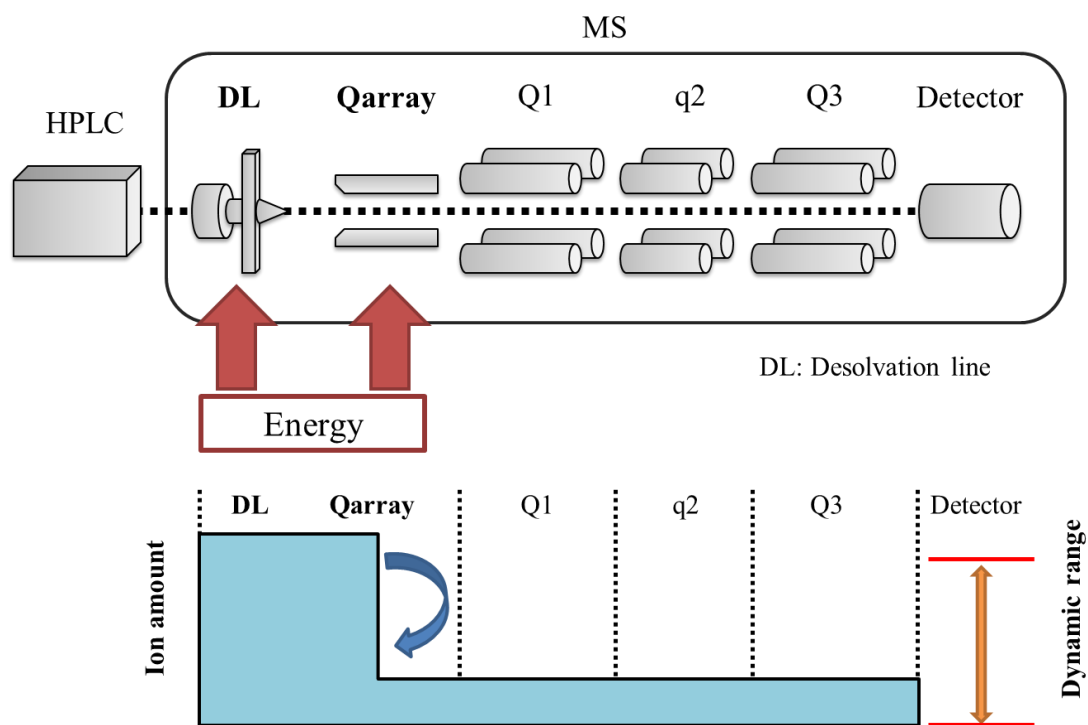
**Figure 4. Calibration curve for (A) sorafenib and (B) pazopanib**

The calibration curves for sorafenib and pazopanib were good at 100-5000 ng/mL and 500-2500 ng/mL, respectively, but good linearity was not obtained in the high concentration range.

## インソース CID を用いた分析条件の最適化

ソラフェニブとパゾパニブの高濃度領域で直線性が得られない原因として、検出器の飽和が考えられる。質量分析計の検出器は、入射した荷電粒子から生じた電子を増幅させて電流として検出するが、一定量以上の荷電粒子が入射しても電流値が上昇しなくなり、荷電粒子の個数と電流値の間の直線性が失われることがある。これを検出器の飽和と呼び、イオン化しやすい分子の検出時に見られることがある。これを回避するには、検出器に到達する荷電粒子の個数そのものを減じる必要がある。その方策として、システムに注入する量を調節する、イオン化する量を抑える、いったん生じたイオンを分解して量を調節するなどが考えられる。最近、インソース衝突誘起解離 (collision-induced dissociation, CID) を活用して質量分析計に導入するイオン量を調節し、検出器の飽和が見られた化合物の高濃度領域の直線性を回復する手法が報告されている[45-47] (Figure 5)。本法は、オリフィス孔に印加する電圧 (Desolvation bias、Qarray bias) の調整により、イオン分離部に導入するイオン量を任意に調節することが可能であり、物性の異なる化合物の同時分析に適用しやすい。そこで、ソラフェニブとパゾパニブについて、本法を用いて MS に導入するイオン量を減らすことにより、定量範囲を高濃度側にシフトすることを考えた。ソラフェニブとパゾパニブの分析時に、オリフィス孔に印加する電圧を徐々に上げると、各化合物のプロトン付加分子のピーク強度の減少が確認された。電圧調節により、ソラフェニブとパゾパニブの検量線範囲を、それぞれ 100~5,000 ng/mL から 100~10,000 ng/mL、500~25,000 から 500~50,000 ng/mL と、臨床検体の測定に十分適用可能な高濃度域にシフトさせることに成功した (Table 4)。また、本法の分析法バリデーションを行ったところ、各薬物の日間再現性において真度が 93.9~111.8%、精度が 0.8~9.3%であり、また、日間再現性では真度が 88.3

～107.7%、精度が 1.6～10.3%であり、いずれも良好な再現性を示した。以上の結果、高精度で、迅速性と簡便性を兼ね備えた TKI の一斉測定法の構築に成功した。



**Figure 5. Method for controlling ion amounts on MS/MS by in-source CID**

By adding energy to the in-source CID (DL and Qarray) of a mass spectrometer, the dynamic range can be adjusted by reducing the amount of introduced ions.

**Table 4. Linearity ranges, slope, and intercept of each analyte by in-source CID**

Analyte	Linearity range (ng/mL)	Slope	Intercept
Sorafenib			
normal	100-5,000	2.311	-0.138
in-source CID	100-10,000	1.648	-0.086
Pazopanib			
normal	500-25,000	1.082	0.183
in-source CID	500-50,000	1.648	-0.086

### 第3節 症例

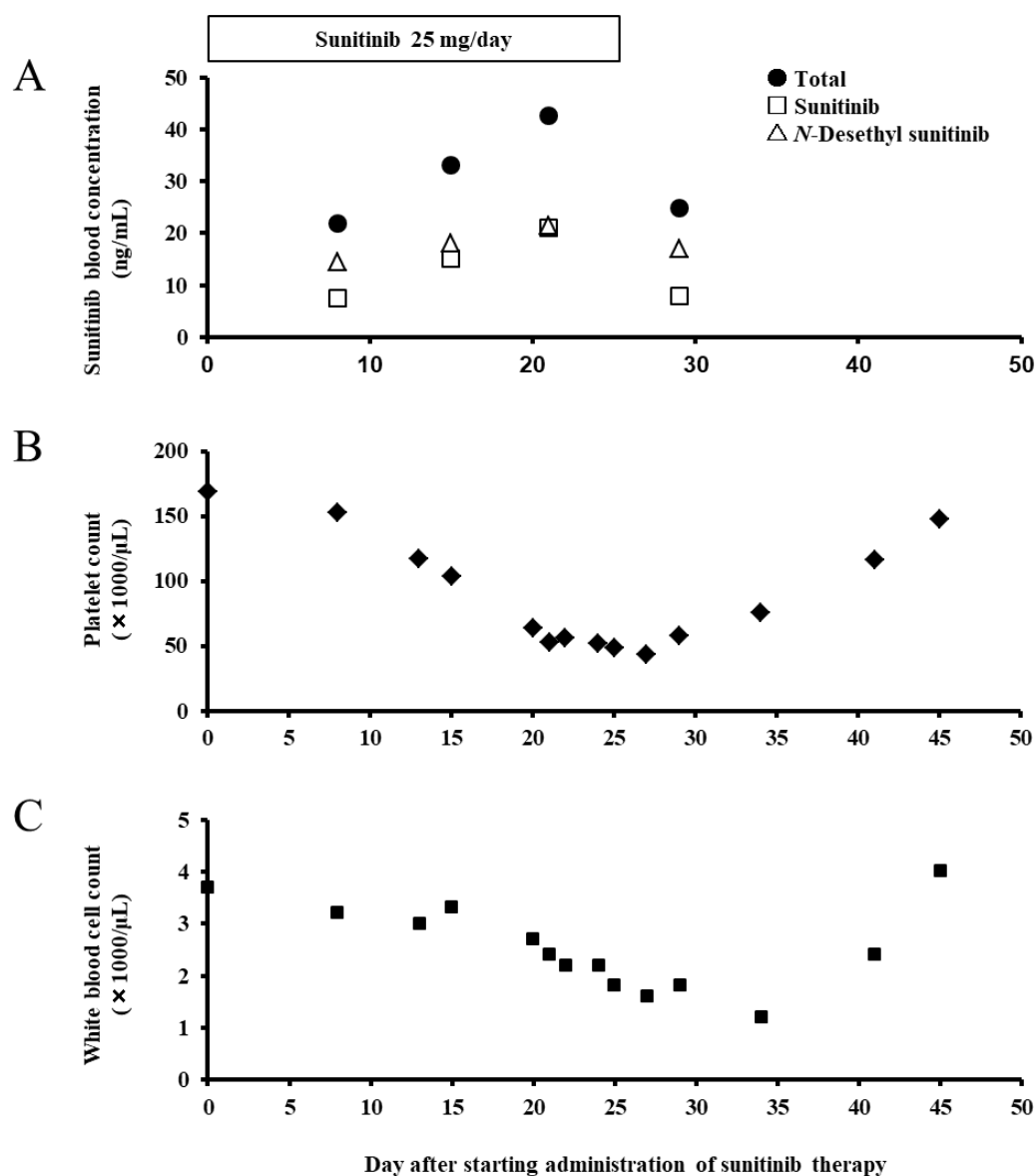
#### スニチニブ

透析患者において血中スニチニブ濃度をモニターしながら治療した1症例の各種パラメータの推移を Figure 6 に示す。本症例は60歳男性で、左腎癌にて腎摘除が施行され、嚢胞腎にて血液透析が導入された。その後、リンパ節転移、骨転移、脳転移が認められ、スニチニブが導入された。スニチニブ 25 mg/日にて投与開始（4週投与2週休薬）されたが、初回コースの26日目にグレード3の血小板減少症（血小板数 49,000 / $\mu$ L）と白血球減少症（白血球数 1600 / $\mu$ L）の有害事象を示したため（Figure 6 B, C）、治療中断された。スニチニブ及び *N*-デスエチルスニチニブの各血中濃度と *N*-デスエチルスニチニブ／スニチニブ比は、服用21日目に21.1、21.4 ng/mL、1.0、スニチニブ中止後4日目に7.9、16.9 ng/mL、2.1 と推移した（Figure 6A）。また、本症例のスニチニブと *N*-デスエチルスニチニブの排泄半減期は、それぞれ50.8時間と211.4時間であった。その後、本症例は脳転移があり、またスニチニブによる血小板減少とスニチニブの排泄遅延があることから、2コース目の治療は中止され、転院となった。

スニチニブの薬物動態は、腎機能により大きな影響を受けないとされている[48]。また、透析患者において、スニチニブ及び *N*-デスエチルスニチニブの薬物動態は血液透析の影響を受けず、スニチニブ療法が安全に行われたとの症例報告もある[49,50]。本症例のスニチニブ総濃度は50 ng/mLを下回っていたが、重篤な有害事象が発現した。Faivreらの報告では *N*-デスエチルスニチニブ／スニチニブ比は0.43であるが[18]、本症例では1.0を超えていた。また、血液透析を必要とする末期腎疾患の患者について、スニチニブと *N*-デスエチルスニ

チニブの排泄半減期は、それぞれ 70 時間と 111 時間と報告されているが[48]、本症例の半減期は 50.8 時間と 211.4 時間であった。よって、本症例における重篤な有害事象発現の理由として、スニチニブの代謝物である *N*-デスエチルスニチニブの排泄遅延が原因と推察された。本症例から、スニチニブだけでなく、*N*-デスエチルスニチニブの血中濃度のモニタリングも、有害事象の早期発見に重要であると考えられた。





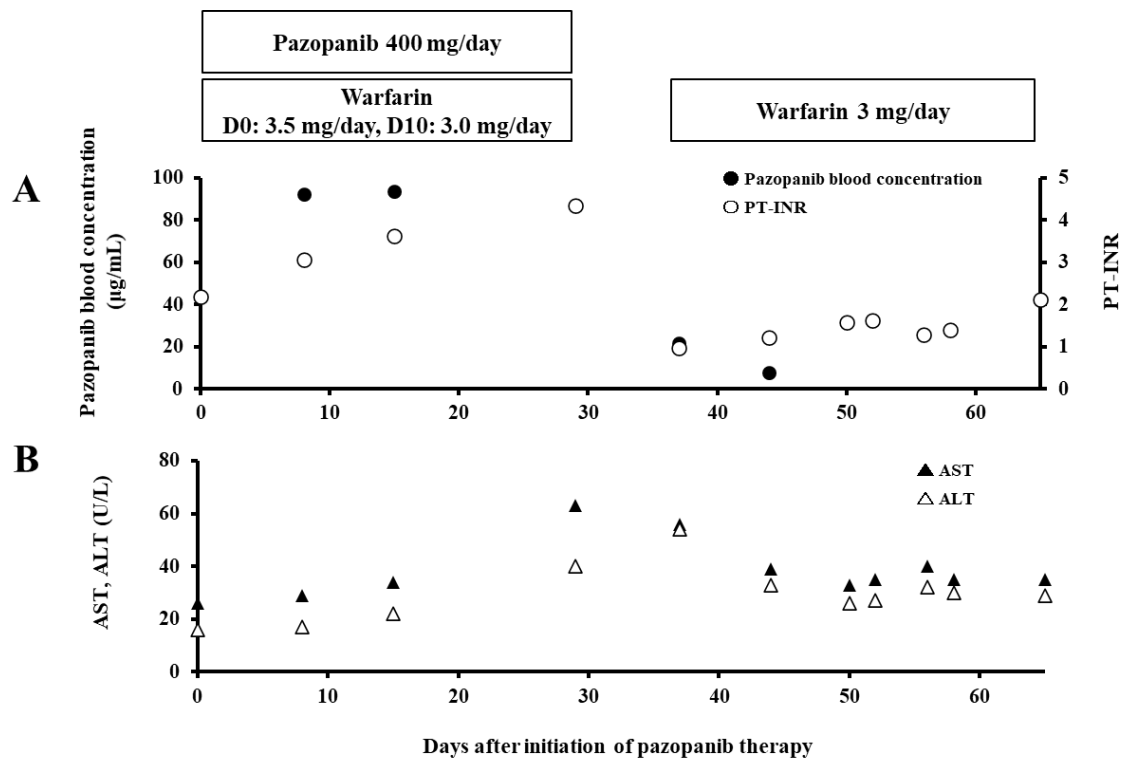
**Figure 6.** Change in (A) plasma concentration of total (sunitinib + *N*-desethyl sunitinib), sunitinib and *N*-desethyl sunitinib, (B) platelet count, and (C) white blood cell count in the patient after starting sunitinib therapy

## パゾパニブ

パゾパニブによりプロトロンビン時間国際標準比 (prothrombin time-international normalized ratio, PT-INR) が上昇した 1 症例を Figure 7 に示す。本症例は 75 歳男性で、左腎癌にて腎摘除術が施行された。その 4 年後、右腎に再発が認められ、パゾパニブが導入となった。既往として心房細動があり、ワルファリンを服用していた。入院後、パゾパニブ 400 mg/日にて投与開始されたが、投与開始 8 日目にグレード 1 の白血球減少症及び血小板減少症が出現した。ワルファリンの効果の指標である PT-INR がパゾパニブ開始前に比べ 2.19 から 3.07 に上昇したことから (Figure 7A)、10 日目にワルファリンを 3.5 mg/日から 3.0 mg/日に減量し、その後、外来に移行した。28 日目の外来受診時に、PT-INR が 4.34 とさらに延長し、肝機能検査値であるアラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase, ALT) とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase, AST) についてもグレード 1 の上昇が認められたことから (Figure 7B)、パゾパニブ及びワルファリンが中断された。その 1 週間後、PT-INR、ALT 及び AST が回復したことからワルファリンは再開されたが、パゾパニブは肝機能障害を懸念し投与終了となった。パゾパニブ治療前後において、併用薬の変化はなかった。

パゾパニブは肝機能障害を引き起こすため[15]、その治療にあたっては肝機能検査のモニターは必須である。本症例では、パゾパニブ開始により肝機能検査値が上昇し、その中止によって回復したことから、パゾパニブによる肝機能障害が考えられた。パゾパニブの有効血中濃度は 20.5~50.3 µg/mL とされているが[29,43]、本症例では投与開始 8 日目の血中濃度は 92.1 µg/mL であり、有効濃度域を大きく超えていた (Figure 7A)。本症例ではパゾパニブの血中濃度がもともと高かった可能性や、肝機能障害により薬物代謝能が低下した結果、

血中濃度が上昇した可能性が考えられた。パゾパニブはワルファリンの薬物動態に影響を及ぼさないことが報告されている[51]。また、肝機能障害によって PT-INR が上昇することから[52]、本症例ではパゾパニブにより肝機能障害が引き起こされ、PT-INR の上昇に繋がったと考えられる。本症例から、パゾパニブ血中濃度を早期からモニターすることで、重篤な有害事象や薬物相互作用を予測できることが示唆された。



**Figure 7. Changes in PT-INR and liver function after combined use of pazopanib**

PT-INR: prothrombin time-international normalized ratio

AST: aspartate aminotransferase

ALT: alanine aminotransferase

## 第4節 血中スニチニブ濃度と臨床効果との関連性評価

### 第1項 方法

#### 対象患者

本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を受け（No. 2011-385）、2011年12月～2017年2月に、当院泌尿器科で転移性腎細胞癌（metastatic renal cell carcinoma, mRCC）の治療目的にスニチニブが投与された患者のうち、研究開始前に書面を用いて十分に説明し、同意の得られた患者を対象に実施した。なお、転院により治療状況を追跡できなかった患者については、その時点で除外した。スニチニブ治療は、4週投与2週休薬、または2週投与1週休薬のスケジュールで行われた。初回投与量は、患者の年齢、ボディマス指数（body mass index, BMI）及び全身状態（performance status, PS）により患者毎に選択された。スニチニブが定常状態に到達する投与開始14日か15日目[26]、もしくは中止直前に採血した。血中スニチニブ濃度は第1章の方法を用い測定した。また、個体間変動の要因を確認するため、総濃度／投与量（concentration-to-dose, C/D）比と、患者の年齢、体重及び体表面積（body surface area, BSA）との関連性を評価した。

#### 安全性評価

スニチニブ治療開始後の有害事象は、Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0 に従い評価した。スニチニブ治療における有害事象の多くは投与開始6週以内に発現することから[34]、スニチニブ治療開始6週間以内の総血中濃度と有害事象との関連性を評価した。さらに、各患者の総血中濃度について、有効範囲50～100 ng/mL を基に4つの群（<50 ng/mL、50～75 ng/mL、75～100 ng/mL、≥100 ng/mL）に分けて、有害事象

のプロファイルとの関連性について評価した。

### 薬効評価

薬効の評価項目として、治療成功期間 (time to treatment failure, TTF) 及び無増悪生存期間 (progression free survival, PFS) を用いた。TTF は、スニチニブ治療開始から病勢進行もしくは有害事象により投与終了となった日までとした。PFS は、スニチニブ治療開始から、病勢進行もしくは死亡した日までとした。また、治療開始後に用量変更された患者については、最も服用期間が長かった用量を維持量と定義した。この維持量投与時の総血中濃度を、最小有効総血中濃度とされる 50 ng/mL[31]を基準に 2 群に分け、TTF 及び PFS を比較した。さらに、長期間スニチニブを服用できた患者の総血中濃度推移を観察するために、1 年以上スニチニブを服用できた患者の総血中濃度を追跡調査した。また、外来移行後は、各サイクル 14 日目以降で外来受診日の服用直前の検体を使用した。

### 統計解析

追跡調査打切り日は、2017 年 2 月末とした。連続変数は Wilcoxon rank sum test、カテゴリ変数は chi-squared test もしくは Fisher's exact test を用いて解析した。総血中濃度と患者の年齢、体重、及び BSA との相関は、Spearman's rank correlation coefficient を使用して解析した。TTF と PFS は、カプランマイヤー曲線を作成し、log-rank test により解析し、すべて、*P* 値が 0.05 未満であれば有意とした。統計解析には、JMP pro 12.0.1 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた。

## 第2項 結果

### 患者背景

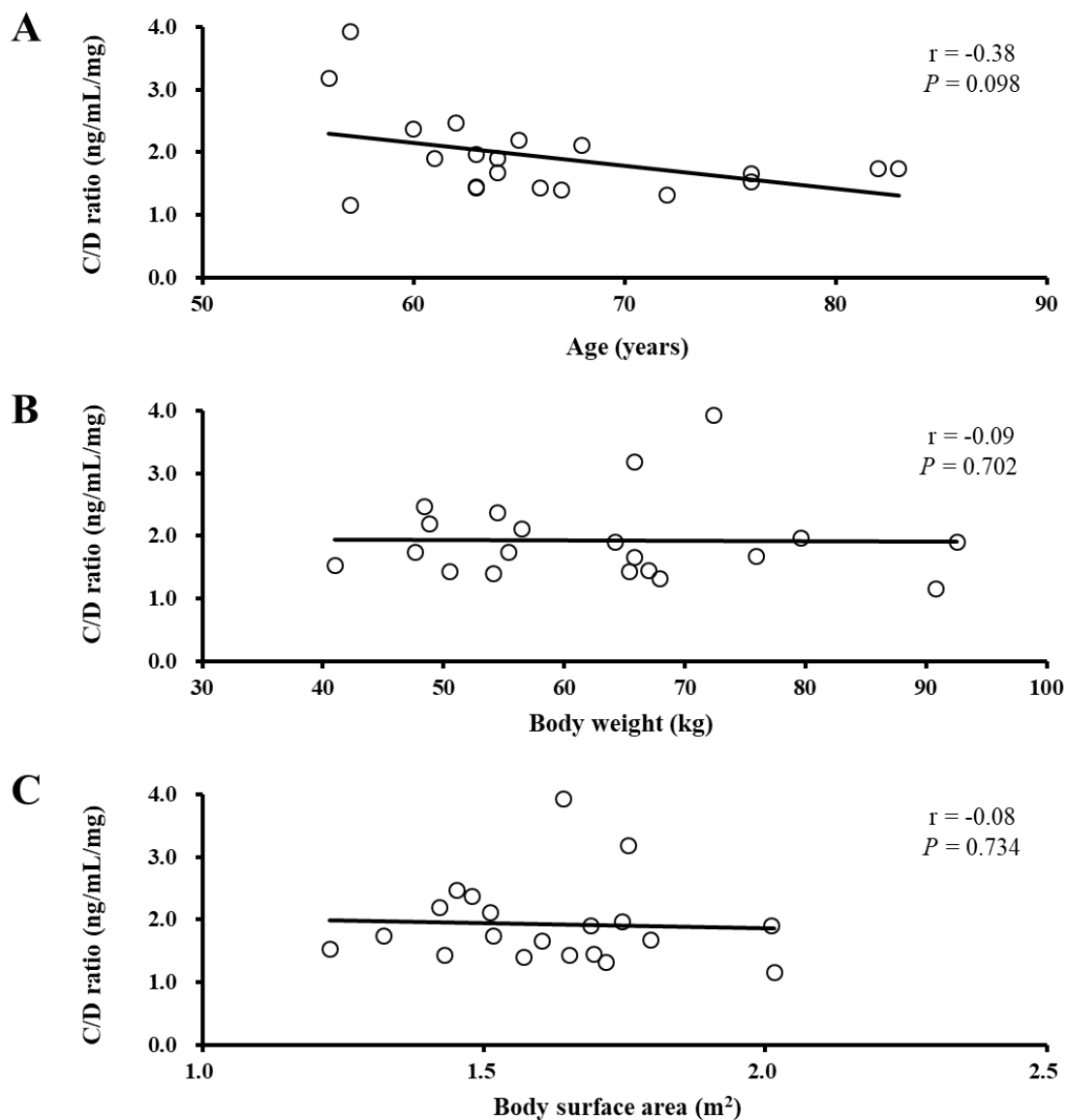
スニチニブが投与された20例の日本人患者を対象に評価した (Table 5)。年齢及び体重の中央値 (範囲) は、64 (56～83) 歳、64.8 (41.0～92.6) kg であった。スニチニブの初回投与量は、8 人が 50 mg、7 人が 37.5 mg、5 人が 25 mg であった。TTF 及び PFS の中央値は、225 日 (95%信頼区間[confidence interval, CI], 56～743)、222 日 (95% CI, 56～743) であった。また、C/D 比と、年齢、体重及び体表面積との間に、有意な相関は認められなかった (Figure 8)。

**Table 5. Patients' characteristics**

Characteristics	
Patients, n	20
Age (years) †	64 (56-83)
Male/Female, n	12/8
Body weight (kg) †	64.8 (41.0-92.6)
Body surface area (m <sup>2</sup> ) †	1.6 (1.2-2.0)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> ) †	23.5 (18.4-33.7)
Aspartate aminotransferase (UI/L) †	19 (12-46)
Alanine aminotransferase (UI/L) †	15 (6-33)
Serum creatinine (mg/dL) †	1.10 (0.67-1.41)
Histology, n	
Clear cell	17
Papillary	2
Unknown	1
Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status , n	
0	15
1	3
2	2
Sites of metastases, n	
Lung	14
Liver	1
Bone	6
Lymph nodes	5
Other	5
Previous regimens, n	
0	19
Interferon-alfa	1
Initial dose, n	
50 mg/day	8
37.5 mg/day	7
25 mg/day	5
Schedule, n	
4 weeks-on 2 weeks-off	4
2 weeks-on 1 weeks-off	16

†Values were reported as median (range).





**Figure 8.** The relationships between the concentration-to-dose (C/D) ratio of sunitinib in the first course and patients' demographic data [(A) age, (B) body weight, and (C) body surface area] analyzed with Spearman's rank correlation coefficient

## 安全性評価

スニチニブ投与 1 コース目において、有害事象が原因で中止、休薬もしくは減量された患者 13 例の総血中濃度の中央値は 92.7 ng/mL であり、2 コース目も同量で継続できた患者 7 例の中央値 43.4 ng/mL に比べ、有意に高値を示した (Table 6)。また、50 mg で投与開始した全例で、6 週間以内に有害事象により減量された。1 コース目の総血中濃度を 4 つのグループに分類し、6 週間以内のグレード 3 以上の有害事象発現数を Table 7 に示す。好中球減少症が 7 例 (35%) で認められ、白血球減少症が 5 例 (25%)、リパーゼ増加及び血小板減少症が 4 例 (20%)、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP) 増加が 3 例 (15%)、疲労、高血圧、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase,  $\gamma$ -GTP) 増加、及び貧血がそれぞれ 2 例 (10%)、食欲不振、嘔気、口内炎、歯肉炎、発熱、AST 増加及びアミラーゼ増加がそれぞれ 1 例 (5%) に見られた。また、総血中濃度が 75 ng/mL を超えた全 9 例において、有害事象によりスニチニブの減量または治療中断となった。

**Table 6. The relationships between total sunitinib concentration and treatment status at 6 weeks after starting sunitinib**

	Treatment status at 6 weeks after starting sunitinib		P value
	Continuation	Discontinuation or dose reduction	
Patients, n	7	13	
Age (years) <sup>†</sup>	76 (63-83)	63 (56-68)	0.011 §
Male/Female	4/3	8/5	1.000 ¶
Body weight (kg) <sup>†</sup>	55.4 (41.0-67.9)	65.5 (48.5-92.6)	0.219 §
Body surface area (m <sup>2</sup> ) <sup>†</sup>	1.5 (1.2-1.8)	1.7 (1.4-2.0)	0.077 §
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>†</sup>	23.6 (20.8-28.0)	23.4 (18.4-33.7)	0.721 §
Aspartate aminotransferase (UI/L) <sup>†</sup>	18 (14-29)	19 (12-46)	0.842 §
Alanine aminotransferase (UI/L) <sup>†</sup>	13 (6-33)	16 (9-29)	0.526 §
Serum creatinine (mg/dL) <sup>†</sup>	1.09 (0.67-1.29)	1.12 (0.68-1.41)	0.529 §
Performance Status, n			
0	6	9	-
1	1	2	
2	0	2	
Previous regimens, n			
0	6	13	-
Interferon-alfa	1	0	
Initial dose, n			
50 mg/day	0	8	-
37.5 mg/day	3	4	
25 mg/day	4	1	
Schedule, n			
4 weeks-on 2 weeks-off	1	3	-
2 weeks-on 1 weeks-off	6	10	
Total sunitinib concentration (ng/mL) <sup>‡</sup>	43.4 (38.3-54.1)	92.7 (52.7-196.9)	0.001 §

<sup>†</sup>Values were reported as median (range), <sup>‡</sup>Plasma concentrations of total sunitinib (sunitinib + *N*-desethyl sunitinib) of first course were reported as median (range), §Continuous variables were performed by Wilcoxon rank sum test and ¶categorical variables by Fisher exact test.

**Table 7. The relationships between total sunitinib concentration of the first course and adverse events of grade  $\geq 3$  within 6 weeks**

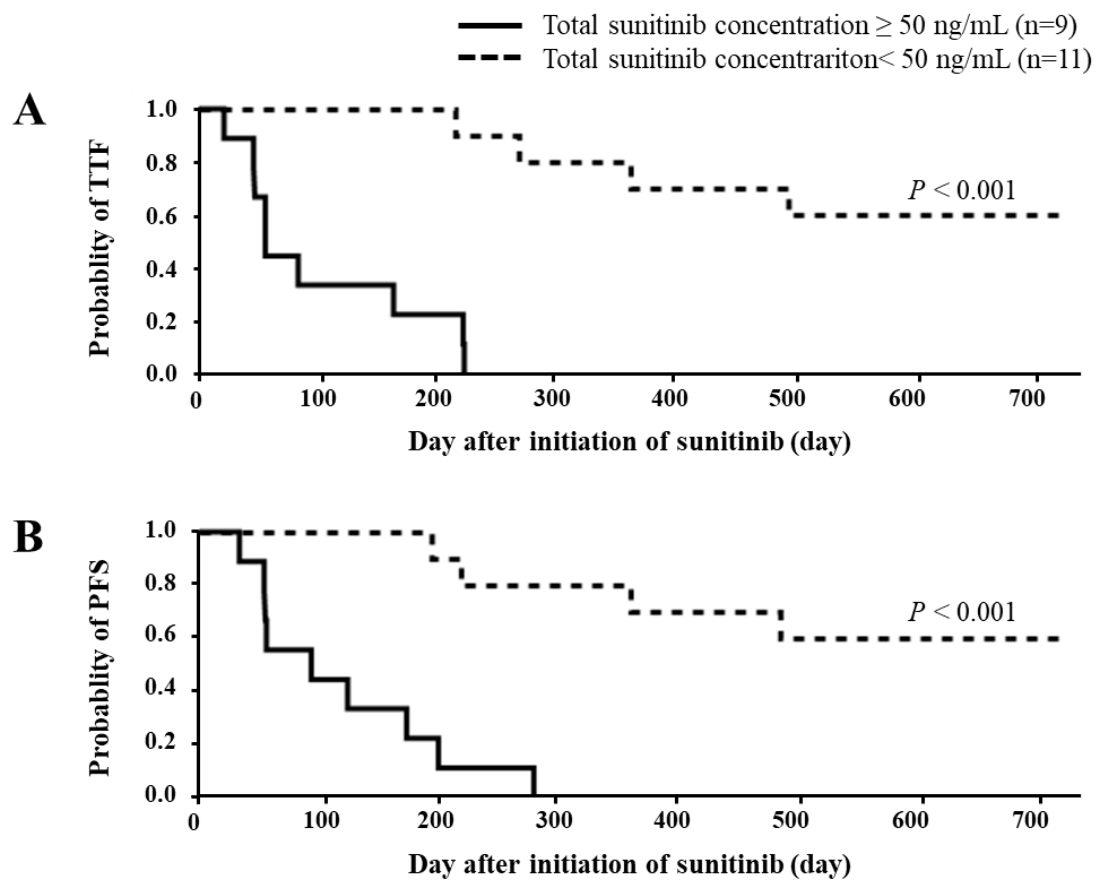
	Total sunitinib concentration range of the first course			
	< 50	50-75	75-100	$\geq 100$
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
Total patients, n	5	6	6	3
Discontinuation by adverse events within 6 weeks, n	0	1	0	0
Dose reduction by adverse events within 6 weeks, n	0	3	6	3
Initial dose, n				
50 mg/day	0	2	4	2
37.5 mg/day	1	3	2	1
25 mg/day	4	1	0	0
Adverse events of grade $\geq 3$ , n				
Fatigue	0	1	1	0
Anorexia	0	0	0	1
Nausea	0	1	0	0
Mucositis oral	0	0	1	0
Periodontal disease	0	0	1	0
Fever	0	0	0	1
Hypertension	0	0	1	1
Increased aspartate aminotransferase	0	1	0	0
Increased alkaline phosphatase	0	1	2	0
Increased $\gamma$ -glutamyl transpeptidase	0	0	2	0
Increased lipase	0	1	3	0
Increased amylase	0	0	1	0
Leukopenia	0	1	3	1
Neutropenia	0	1	4	2
Thrombocytopenia	0	2	1	1
Anemia	0	0	2	0

## 薬効評価

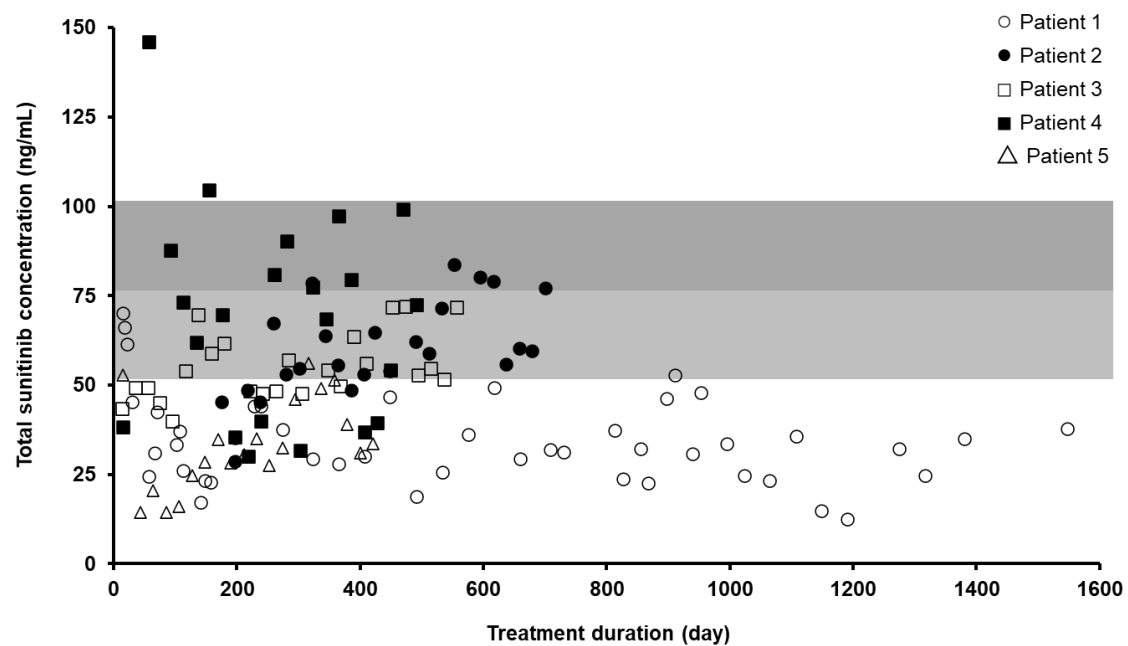
維持量投与時の総血中濃度を 50 ng/mL で 2 群に分けた場合の患者背景を Table 8 に、総血中濃度と TTF 及び PFS との関係を Figure 9 に示した。総血中濃度が 50 ng/mL 以上の群 (n=9) では、TTF が 56 日 (95% CI, 21~179)、PFS が 95 日 (95% CI, 34~179) であった。総血中濃度が 50 ng/mL 未満の群 (n=11) では、TTF が 743 日 (95% CI, 217~1583)、PFS が 731 日 (95% CI, 197~1576) であった。維持量投与時の総血中濃度が低い群の方が、TTF 及び PFS が有意に良好な結果となった。また、1 年以上スニチニブ治療が継続できた 8 人の患者のうち、定期的に外来でフォローできた 5 例について追跡調査したところ、スニチニブの総血中濃度は最小有効濃度とされる 50 ng/mL を下回っている患者も見られた (Figure 10)。

**Table 8. The relationship between total sunitinib concentration at the maintenance dose and patients' characteristics**

	Total sunitinib concentration of maintenance dose	
	<50 ng/mL	≥50 ng/mL
Patients, n	11	9
Status of sunitinib therapy, n		
Treatment ongoing	5	0
Discontinuation by adverse events	0	7
Discontinuation by progressive disease	6	2
Histology, n		
Clear cell	10	7
Papillary	0	2
Unknown	1	0
ECOG PS, n		
0	9	6
1	1	2
2	1	1
Sites of metastases, n		
Lung	9	5
Liver	1	0
Bone	4	2
Lymph nodes	2	3
Other	3	2
Initial dose, n		
50 mg/day	4	4
37.5 mg/day	3	4
25 mg/day	4	1
Maintenance dose, n		
50 mg/day	0	0
37.5 mg/day	4	7
25 mg/day	6	2
12.5 mg/day	1	0



**Figure 9.** The relationships between total sunitinib concentrations at the maintenance dosage and time to treatment failure (TTF) **A**) and progression-free survival (PFS) **B**) examined with the Kaplan-Meier method and the log-rank test



**Figure 10. Changes in total sunitinib concentrations at every routine outpatient visit of patients who were able to continue sunitinib treatment for more than 1 year**



## 第5節 考察

本章では、TKI の血中濃度一斉測定法の構築、症例を用いた血中濃度情報の有用性、さらにスニチニブの PK/PD 解析について示した。

TKI を同時併用することはないが、LC-MS/MS を用いた TKI の一斉測定法を構築することにより、多くの検体を連続して測定できるようになり、測定時間と作業量を大幅に短縮できた。また、本法で用いたインソース CID によるイオン量調節は、他の薬物の測定にも応用可能であり、実臨床での TDM を想定すると、非常に有用な方法と考えられる。

本法を用いて、実際に血中濃度を測定したスニチニブの症例は、スニチニブだけでなく N-デスエチルスニチニブのモニターの重要性を示した。また、パゾパニブの症例については、血中濃度をモニターすることで、有害事象や薬物相互作用を早い段階で予測できる可能性を示した。以上より、TKI の血中濃度測定は、有害事象を管理しながら治療継続する上で重要なツールとなると考えられる。

スニチニブの PK/PD 解析を実施したところ、薬効の評価項目である PFS の中央値は 30.0 週であり、日本人における治験の結果（46 週）[34]よりも実臨床の結果（22.7 週）[35]に近い。スニチニブは AUC が高い方がより高い抗腫瘍効果を示す[30]。一方、スニチニブの AUC が重篤な有害事象と相関するとの報告もある[53]。本研究では総血中濃度の低い患者群の方が TTF 及び PFS ともに有意に良好な結果を示

しており、多くのスニチニブの長期服用患者の総血中濃度も 50 ng/mL を下回っていた。日本人腎癌患者を対象とした研究では、総血中濃度が 100 ng/mL を下回っていた方がより治療成績が良かった[24]との報告もあり、スニチニブの総血中濃度が過度に高くなると重篤な有害事象が発現し、結果的に減量や中止を余儀なくされ、治療成績が悪くなるものと考え

られた。スニチニブ治療成績の向上には、有害事象を管理しながら患者個別に設定した用量で治療を継続することが重要である。すなわち、重篤な有害事象の発現を回避することがきわめて重要であり、スニチニブの血中濃度を確認しながら投与量を細かく調節することが有効と考えられた。スニチニブの有効総血中濃度は 50～100 ng/mL とされているが、日本人における有効総血中濃度については 50 ng/mL を下回る可能性も考えられ、今後患者数を増やして検討する必要がある。

また、血中スニチニブ濃度の個体間変動が認められたが (Table 6)、C/D 比と年齢、体重、及び BSA との有意な相関は認められなかった (Figure 8)。本研究では遺伝子多型に関しては解析していないが、血中スニチニブ濃度の個体間変動に、ATP-binding cassette super-family G member 2 (ABCG2)、CYP3A5、ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1) の関与が報告されている[54-56]。また、血中スニチニブ濃度の個体内変動も認められた (Figure 10)。ソラフェニブは、腸管や肝臓において CYP3A4 を自己誘導することが知られている[27]。スニチニブは有害事象として高血圧を引き起こすが[13,18,26,34]、降圧薬であるニカルジピンがスニチニブの主代謝酵素 CYP3A4 活性を阻害し、血中スニチニブ濃度に影響することも報告されている[23]。がん患者における薬物治療では、病勢進行に伴って、あるいは抗がん薬の副作用対策などの支持療法として様々な薬物が併用されるが、それら薬物との相互作用により、スニチニブの個体内変動が引き起こされる可能性もある。今後、スニチニブの薬物動態に影響を与える因子を調べ、薬物相互作用を予測することも必要と考えられる。

以上、本研究により、日本人の腎癌患者におけるスニチニブの有効濃度は、これまで報告されていた 50～100 ng/mL よりも低い可能性が考えられた。研究の限界として、少数の患者を対象に、単一の施設で実施した観察期間の短い研究であるうえ、前向きな観察研究で、

血中濃度により用量を調節しなかったことがあげられる。しかしながら、血中薬物濃度情報を担当医に開示しており、その結果をもとに用量変更が行われた可能性も考えらえる。

今後、スニチニブの TDM の有用性を検証するには、TDM 群と非 TDM 群で、有害事象の重篤度や発現率、さらに TTF、PFS、及び全生存期間（overall survival, OS）などの薬効に与える影響を比較評価する必要があると考えられる。

## 第2章 哺乳類ラパマイシン標的タンパク質阻害薬

### 第1節 序

腎癌の分子標的治療薬として TKI の他に mTORi があり、経口剤であるエベロリムスと注射剤であるテムシロリムスが本邦で使用される[2,4]。これら mTORi は、シグナル伝達の阻害により、腫瘍細胞の増殖を抑制する直接的作用と、血管新生を抑制する間接的作用により抗腫瘍効果を発揮する[3,4]。有害事象としては、発疹、口内炎、高コレステロール血症及び高グリセリド血症などがあり、とくに間質性肺炎は重篤かつ頻度も高いことから細心の注意が払われる[4,16,17]。経口剤であるエベロリムスは、抗腫瘍薬[57-60]だけでなく免疫抑制薬[61,62]としても臨床使用されるが、治療域が狭く、血中濃度の個体内及び個体間変動があることから、免疫抑制目的に、または結節性硬化症に伴う上衣下巨細胞性星細胞腫の治療目的に使用される場合、PK/PD 理論に基づいた TDM が行われている[63]。免疫抑制薬として使用される際の血中エベロリムス濃度は、他の免疫抑制薬（カルシニューリン阻害薬及びグルココルチコイド）と組み合わせて使用した場合は 3～8 ng/mL に、カルシニューリン阻害薬を併用せずに使用した場合は 6～10 ng/mL に維持する必要がある[63]。一方、結節性硬化症に伴う上衣下巨細胞性星細胞腫の治療に用いる場合は、血中エベロリムス濃度を 5～15 ng/mL に管理することが推奨されている[58,63,64]。

Deppenweiler らは、エベロリムを抗がん薬として使用した場合にトラフ濃度が 26.3 ng/mL を上回ると毒性発現頻度が増加し、11.9 ng/mL を下回ると抗腫瘍効果の減弱に繋がることを報告している[65]。メタアナリシス解析によると、血中濃度が高いと抗腫瘍効果が良好な反面、有害事象が増大することが判明し[66]、また日本人患者の解析でも、高血中濃度は肺障害の発現リスクを増大することが示された[67]。しかし、抗がん薬として使用される場合の

PK/PD 解析は十分に実施されておらず、実臨床で TDM を行うにはエビデンスが不足している[63]。エベロリムスの血中濃度の変動要因として、有害事象による用量調節や薬物相互作用が挙げられる[63]。がん患者においても支持療法として薬物が追加処方されることが多く、それらがエベロリムスの血中濃度に影響する可能性がある。従って、長期的に血中エベロリムス濃度をモニタリングし、臨床効果との関連性を精査することが重要と考えられる。そこで、第 1 章のスニチニブと同様に、腎癌患者における血中エベロリムス濃度を長期的に追跡調査し、血中濃度と臨床効果との関連性を評価した。

## 第2節 血中濃度測定法

経口 mTORi であるエベロリムスは血球移行率が高いことから、血漿ではなく全血をサンプルとして用いる必要があり[68]、前処理の方法が第1章で構築した TKI の一斉測定法とは異なる。よって、TKI の一斉測定法とは別に、Kaol らの方法[69]を参考にした LC-MS/MS 分析法を用いて血中濃度を測定した。すなわち、全血 100  $\mu$ L に 50  $\mu$ L の内標準溶液（100 ng/mL エベロリムス- $^2\text{H}_4$ /メタノール溶液）と 200  $\mu$ L のメタノールを加え、さらに 50  $\mu$ L の 0.2 M 硫酸亜鉛水溶液を加えてよく攪拌した。生じた沈殿を 15,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離した後に、上清 50  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入した。トラップカラムとして Shim-pack MAYI-C8 (10 mm  $\times$  4.6 mm i.d., 50  $\mu$ m, GL Sciences, Tokyo, Japan)を用いたカラムスイッチング前処理法を用い、トラップ用移動相には 2 mM ギ酸アンモニウムを含む水/メタノール/ギ酸溶液（82:18:0.1, v/v/v）を使用し、流速を 0.5 mL/min とした。分析カラムには Luna® phenyl-hexyl column (50 mm  $\times$  2 mm i.d., 5  $\mu$ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA)を用い、移動相として 2 mM ギ酸アンモニウムを含む水/メタノール/ギ酸溶液（10:90:0.1, v/v/v）を流速 0.2 mL/min で送液した。検出は selected reaction monitoring モードで行い、エベロリムス及びエベロリムス- $^2\text{H}_4$  のトランジションをそれぞれ  $m/z$  975.4 $\rightarrow$ 542.0 及び  $m/z$  979.5 $\rightarrow$ 542.2 に設定した。直線性を確保できた血中エベロリムス濃度の定量範囲は 1~50 ng/mL であった。日内及び日間再現性は、精度が 6.6%未満であり、真度が $\pm$ 6.8%以内であった。

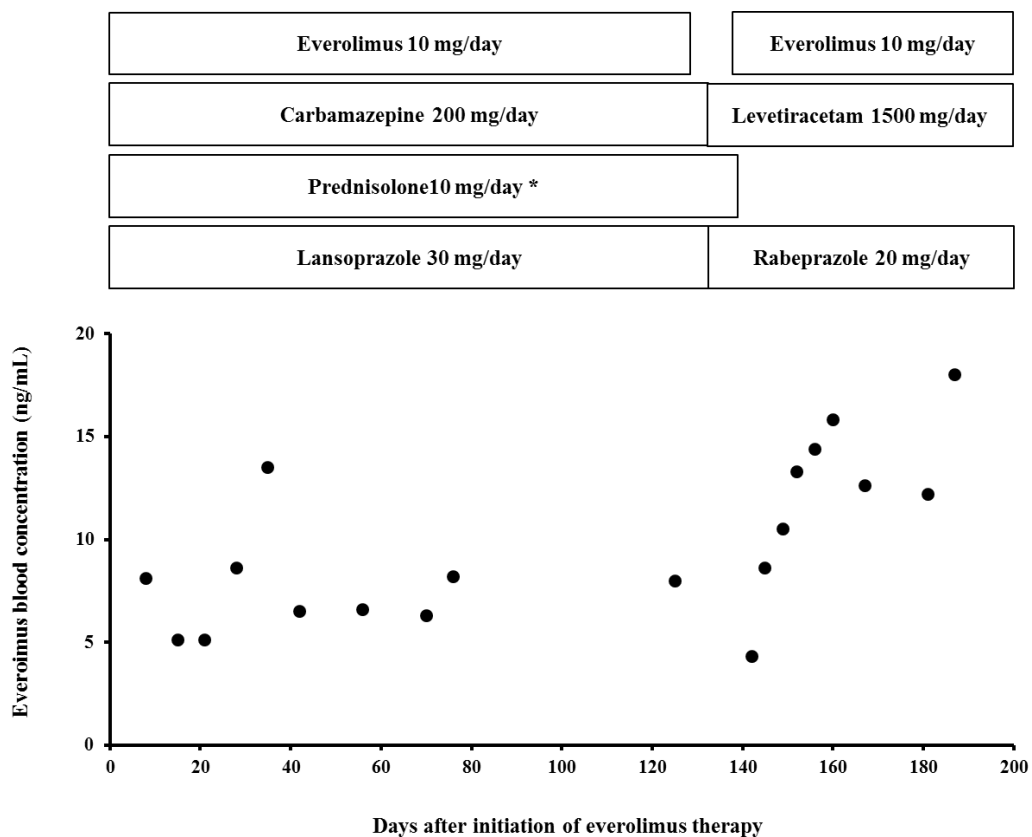
### 第3節 症例

エベロリムスの血中濃度測定により、薬物相互作用が確認できた症例の血中濃度推移と併用薬投与歴を Figure 11 に示した。本症例は 52 歳の女性で、エベロリムス治療開始の 5 年前に腎細胞癌と診断され、右腎部分切除術を受けた。翌年、肺転移が認められたことから、インターフェロンを用いたサイトカイン療法が 3 年間行われたが、病勢進行により、スニチニブ投薬治療に切り替えられた。その半年後、脳転移の出現によりエベロリムス治療が開始されることとなった。脳転移に伴う、症候性てんかん及び脳浮腫に対して、それぞれカルバマゼピン及びプレドニゾロンの投与が開始され、他の併用薬としてランソプラゾール、ドンペリドン、レバミピド、クエン酸第一鉄ナトリウム及びプロブコールを服用していた。エベロリムス投与は 10 mg/日で開始され、グレード 2 以上の有害事象は認められなかった。この患者の平均血中エベロリムス濃度は 7.3 ng/mL であり、臨床試験で報告されているエベロリムス 10 mg/日の平均濃度 13.2 ng/mL と比べ低かった[70]。原因として、併用薬であるカルバマゼピンがエベロリムスの主代謝酵素 CYP3A4 [63]を誘導する可能性があること[71]、ランソプラゾールが CYP3A4 の基質[72]となって薬物相互作用を引き起こす可能性のあることを考え、これらの薬剤を中止し、レベチラセタム[73]とラベプラゾールに変更した[74]。プレドニゾロンも CYP3A4 を誘導する可能性を考慮し[75]、10 mg/日から 5 mg/日に減量し、その後中止となった。これらの投与薬変更後、血中エベロリムス濃度の上昇が認められたが (Figure 11)、重篤な有害事象は見られず、エベロリムス治療は半年間継続された。

がん化学療法における副作用や、病勢進行による症状に対する支持療法として様々な薬物が使用されるため、それらの併用薬や、サプリメント、食品成分による相互作用に注意

が必要である[63]。従って、エベロリムスの血中濃度の定期的なモニタリングは、薬物相互作用の早期発見に有用であると考えられる。





**Figure 11. Changes in blood concentration of everolimus before and after combination with concomitant drugs (carbamazepine, prednisolone, and lansoprazole). \*Prednisolone was reduced from 10 mg/day to 5 mg/day at the same time as carbamazepine and lansoprazole termination, and was discontinued after 1 week**

## 第4節 血中エベロリムス濃度と臨床効果との関連性評価

### 第1項 方法

#### 対象患者

東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を受け (No. 2011-634)、2012 年 4 月～2016 年 12 月に当院泌尿器科で mRCC 治療目的にエベロリムスが投与された患者のうち、研究開始前に書面及び口頭にて説明し、同意の得られた患者を対象に前向き調査した。採血ポイントは、血中エベロリムス濃度が定常状態となる投与 8 日目以降[70,76]の投与直前とした。なお、採血は、入院中は 1 週間毎に、外来移行後は受診日毎に実施した。血中エベロリムス濃度の個体内変動を評価するため、投与 8 日目及び減量または終了直前の血中濃度を比較した。また、血中エベロリムス濃度と、C/D 比、年齢、BSA、BMI 及び推定糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) との相関を調べた。

#### 安全性評価

有害事象は、CTCAE version 4.0 に従って評価し、エベロリムス治療開始 8 日目の血中エベロリムス濃度の中央値に基づいて 2 群に分け血中濃度と有害事象との関連性を調べた。

#### 薬効評価

薬効は、TTF 及び PFS を用いて評価した。TTF は、エベロリムス治療開始から病勢進行もしくは有害事象により投与終了となった日までとした。PFS は、エベロリムス治療開始から、病勢進行もしくは死亡した日までとした。

## 統計解析

追跡調査打ち切り日は、2017 年 3 月末とした。連続変数は Wilcoxon rank sum test、カテゴリー変数は chi-squared test もしくは Fisher's exact test を用いて相関解析した。エベロリムス治療開始 8 日目の血中濃度における C/D 比と、患者の年齢、BSA、BMI 及び eGFR との相関は、Spearman's rank correlation coefficient を使用して解析した。TTF と PFS は、 Kaplan-Meier 曲線をプロットし、log-rank test で検定し、 $P$  値が 0.05 未満であれば有意とした。統計解析には、JMP pro 13.1.0 software を用いた。

## 第2項 結果

### 患者背景

本研究の対象は、日本人患者 10 例であった (Table 9)。年齢及び体重の中央値 (範囲) は、63 (32～74) 歳、57.7 (46.0～65.8) kg であった。エベロリムスの初回投与量は、8 人が 10 mg、1 人が 7.5 mg、1 人が 5 mg であった。

全患者における投与開始後 8 日目の血中エベロリムス濃度の中央値は 15.3 (8.1～28.0) ng/mL であり、減量または終了直前の中央値 14.8 (6.4～58.4) ng/mL と比べて有意な差は認められなかった。また、8 日目から減量または終了直前までの血中エベロリムス濃度の変化量 (絶対値) は 1.65 (0.03～36.60) ng/mL であった。2 例の患者では血中エベロリムス濃度が大きく上昇し (21.8 → 58.4 ng/mL、28.0 → 35.4 ng/mL)、重篤な有害事象が出現した。また、個体間変動については、有意に相関を示すパラメータは認められなかった (Figure 12)。

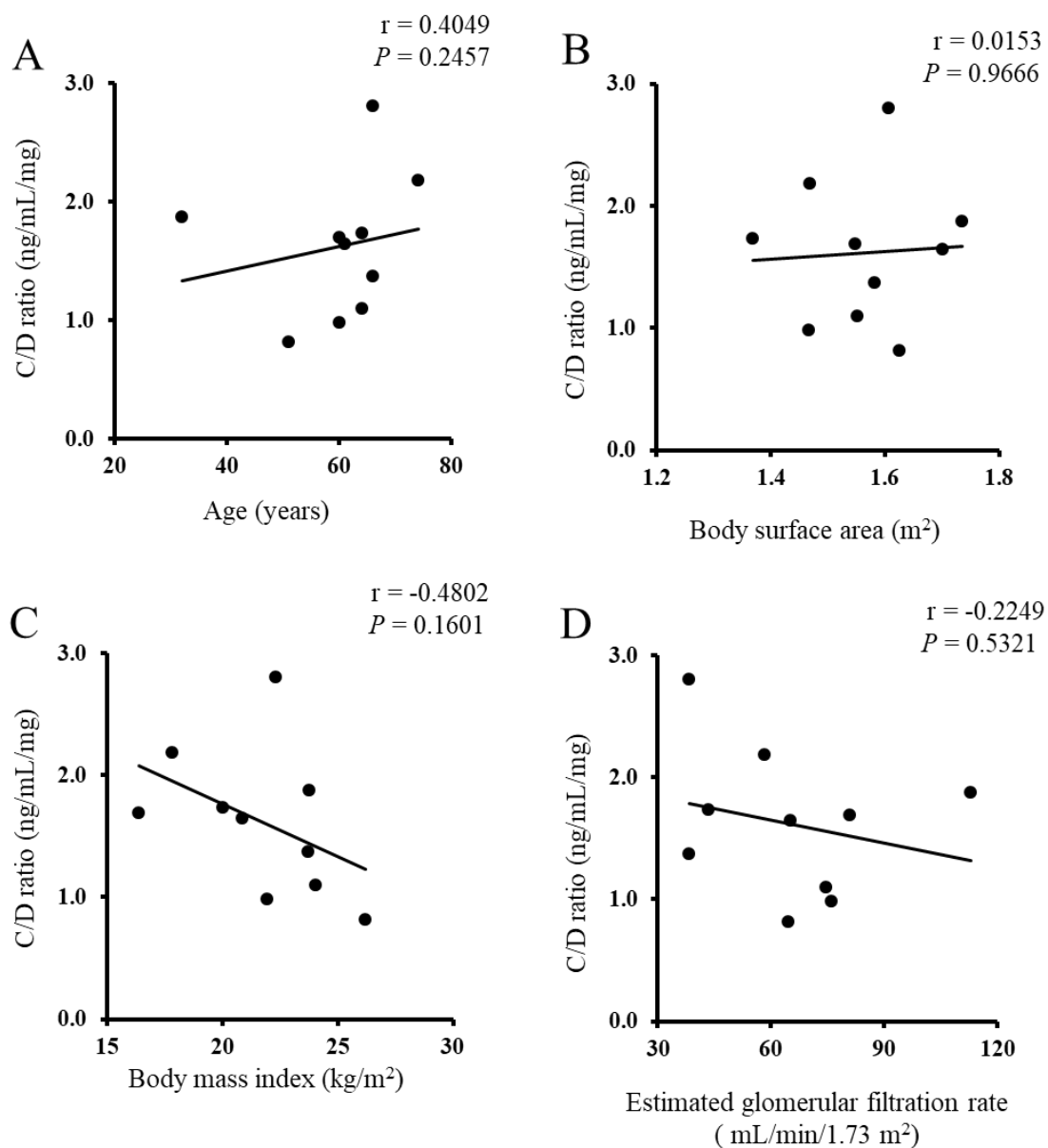
**Table 9. Patients' characteristics**

	Total	Continuation	Discontinuation or dose reduction by adverse events	P value
Patients, n	10	4	6	
Age (years) <sup>a</sup>	63 (32-74)	61 (51-64)	65 (32-74)	0.3329 <sup>b</sup>
Male/Female	5/5	1/3	4/2	0.5238 <sup>c</sup>
Body weight (kg) <sup>a</sup>	57.7 (46.0-65.8)	58.9 (51.3-63.4)	52.9 (46.0-65.8)	0.4555 <sup>b</sup>
Body surface area (m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	1.57 (1.37-1.74)	1.59 (1.47-1.70)	1.56 (1.37-1.74)	0.7476 <sup>b</sup>
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	22.1 (16.3-26.2)	23.0 (20.9-26.2)	21.2 (16.3-23.8)	0.2410 <sup>b</sup>
Aspartate aminotransferase (UI/L) <sup>a</sup>	27 (16-43)	29 (17-43)	27 (16-42)	0.6689 <sup>b</sup>
Alanine aminotransferase (UI/L) <sup>a</sup>	17 (12-47)	26 (12-47)	17 (13-42)	1.0000 <sup>b</sup>
Serum creatinine (mg/dL) <sup>a</sup>	0.84 (0.61-1.47)	0.68 (0.61-0.92)	0.99 (0.66-1.47)	0.0691 <sup>b</sup>
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	64.9 (38.2-113.0)	70.0 (64.5-76.0)	50.9 (38.2-113.0)	0.3938 <sup>b</sup>
ECOG PS, n				
0	6	2	4	0.7143 <sup>c</sup>
1	3	2	1	
2 or more	1	0	1	
Number of prior systemic therapies, n				
2	1	1	0	0.3333 <sup>c</sup>
3	7	2	5	
4 or more	2	1	1	
Initial dose, n				
10 mg/day	8	2	6	0.1333 <sup>c</sup>
7.5 mg/day	1	1	0	
5 mg/day	1	1	0	
Everolimus blood concentration on day 8 after starting everolimus administration (ng/mL) <sup>a</sup>	15.3 (8.1-28.0)	8.2 (8.1-9.8)	18.0 (13.7-28.0)	0.0139 <sup>b</sup>
Everolimus blood concentration just before discontinuation or dose reduction (ng/mL) <sup>a</sup>	14.8 (6.4-58.4)	9.7 (6.4-17.1)	22.9 (12.5-58.4)	0.0142 <sup>b</sup>
Change of everolimus blood concentration just before discontinuation or dose reduction from day 8 (absolute value, ng/mL) <sup>a</sup>	1.65 (0.03-36.60)	2.00 (0.03-8.90)	1.40 (0.20-36.60)	0.3374 <sup>b</sup>

eGFR: estimated glomerular filtration rate, ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance

Status, <sup>a</sup>: Values are reported as median (range), <sup>b</sup>: Continuous variables evaluated by Wilcoxon rank sum

test and <sup>c</sup>: categorical variables by Fisher exact test



**Figure 12.** The relationship between the concentration-to-dose (C/D) ratio of everolimus on day 8 and patients' demographic data [(A) age, (B) body surface area, (C) body mass index, and (D) estimated glomerular filtration rate]

## 安全性評価

有害事象が原因で中止、休薬もしくは減量された患者 6 例の投与 8 日目の血中エベロリムス濃度の中央値は 18.0 ng/mL であり、投与開始から用量を変えずに治療を継続できた患者 4 例の中央値 8.2 ng/mL に比べ有意に高値を示した (Table 9)。また、減量及び治療終了直前の血中濃度についても同様の結果が得られた。

本研究における有害事象のプロファイルを Table 10 に示した。10 例中 8 例で有害事象が発現し、そのうち 5 例でグレード 3 以上の重篤な有害事象が認められた。エベロリムス治療開始 8 日目の血中濃度の中央値 (15.3 ng/mL) に基づいて 2 群に分けて比較したところ、血中濃度が低い群 (n=5) では 3 例の患者で有害事象が発現し、そのうち 2 例でグレード 3 以上の有害事象が認められた。一方、血中濃度が高い群 (n=5) では 5 例全例で有害事象が認められ、そのうち 3 例でグレード 3 以上の有害事象が認められた。グレード 3 の肺炎と白血球減少症については、高濃度群と低濃度群のいずれにおいても、それぞれ 1 例ずつ発現しており、差は認められなかった。

個別のデータを Table 11 に示した。平均血中濃度が 13.1 ng/mL 以上の患者 (Pat 2, 3, 4, 7, 9, 10) では、減量及び治療中断が行われていた。また、有害事象による中断日も、3 ヶ月以内の早期だけでなく、半年を超えた患者においても認められた。最も血中濃度が高値を示した患者 Pat. 4 は、エベロリムス誘発の肝機能障害も認められ、 $\gamma$ -GTP 上昇、低アルブミン血症、高血糖が出現した[77]

**Table 10. Relationship between adverse events and everolimus blood concentration**

	Everolimus blood concentration just before discontinuation or dose reduction (ng/mL)					
	Total (n=10)		≤ 15.3 (n=5)		> 15.3 (n=5)	
	All grades	Grade 3 or 4	All grades	Grade 3 or 4	All grades	Grade 3 or 4
Number of patients						
Any event	8	5	3	2	5	3
Fatigue	1	0	0	0	1	0
Nausea	1	0	0	0	1	0
Vomiting	1	0	0	0	1	0
Mucosal inflammation	5	0	2	0	3	0
Diarrhea	1	0	0	0	1	0
Rash	2	0	1	0	1	0
Pneumonitis	4	2	2	1	2	1
Increased aspartate aminotransferase	2	0	0	0	2	0
Increased alanine aminotransferase	2	0	0	0	2	0
Increased alkaline phosphatase	3	0	0	0	3	0
Increased $\gamma$ -glutamyltransferase	1	1	0	0	1	1
Leukopenia	3	2	1	1	2	1
Neutropenia	2	0	1	0	1	0
Thrombocytopenia	2	0	0	0	2	0
Anemia	2	0	0	0	2	0
Hypoalbuminemia	1	1	0	0	1	1
Hyperglycemia	2	1	0	0	2	1



**Table 11. Everolimus blood concentration at the time of discontinuation or dose reduction by adverse events**

Patient number	Number of measurements	Everolimus blood concentration, Mean $\pm$ SD (ng/mL)	Discontinuation or dose reduction by adverse events			
			Discontinuation or dose reduction	Date (day)	Everolimus blood concentration (ng/mL)	Adverse events
Pat.1	22	11.2 $\pm$ 4.6	-	-	-	-
Pat.2	9	16.4 $\pm$ 6.2	Discontinuation	147	17.5	AST (G2), ALT (G2), ALP (G2), Hyperglycemia (G2), Mucosal inflammation (G2), Fatigue (G2), Pneumonitis (G1), Diarrhea (G1), Leukopenia (G1), Neutropenia (G1)
Pat.3	2	13.1 $\pm$ 0.6	Discontinuation	26	12.5	Pneumonitis (G3), Mucosal inflammation (G2)
Pat.4	4	27.9 $\pm$ 18.0	Dose reduction	15	58.4	Hyperglycemia (G3), Hypoalbuminemia (G3), $\gamma$ -GTP (G3), AST (G2), ALP (G2), ALT (G1)
			Discontinuation	41	19.1	AST (G1), ALT(G1), ALP(G1)
Pat.5	15	8.4 $\pm$ 2.5	-	-	-	-
Pat.6	3	10.2 $\pm$ 0.6	-	-	-	-
Pat.7	12	18.8 $\pm$ 4.8	Discontinuation	265	20.4	Leukopenia (G3), Thrombocytopenia (G2)
Pat.8	3	8.2 $\pm$ 0.5	-	-	-	-
Pat.9	4	27.6 $\pm$ 4.9	Discontinuation	98	35.4	Pneumonitis (G3), Mucosal inflammation (G2)
Pat.10	5	18.7 $\pm$ 1.3	Dose reduction	16	17.1	Mucosal inflammation (G2), ALP (G1), Nausea (G1), Vomiting (G1)
			Discontinuation	93	19.5	ALP (G1), Nausea (G1)

AST: Increased aspartate aminotransferase, ALT: Increased alanine aminotransferase, ALP: Increased alkaline phosphatase,  $\gamma$ -GTP: Increased  $\gamma$ - glutamyl transpeptidase

## 薬効評価

全患者の TTF 及び PFS の中央値は、それぞれ 96 日 (95% CI、26~288)、235 日 (95% CI、28~291) であった。また、エベロリムス治療開始 8 日目の血中濃度の中央値 (15.3 ng/mL) で 2 群に分けて比較したところ、TTF ( $P = 0.5622$ 、Figure 13A) 及び PFS ( $P = 0.3436$ 、Figure 13B) のどちらも 2 群間で有意な差は認められなかった。

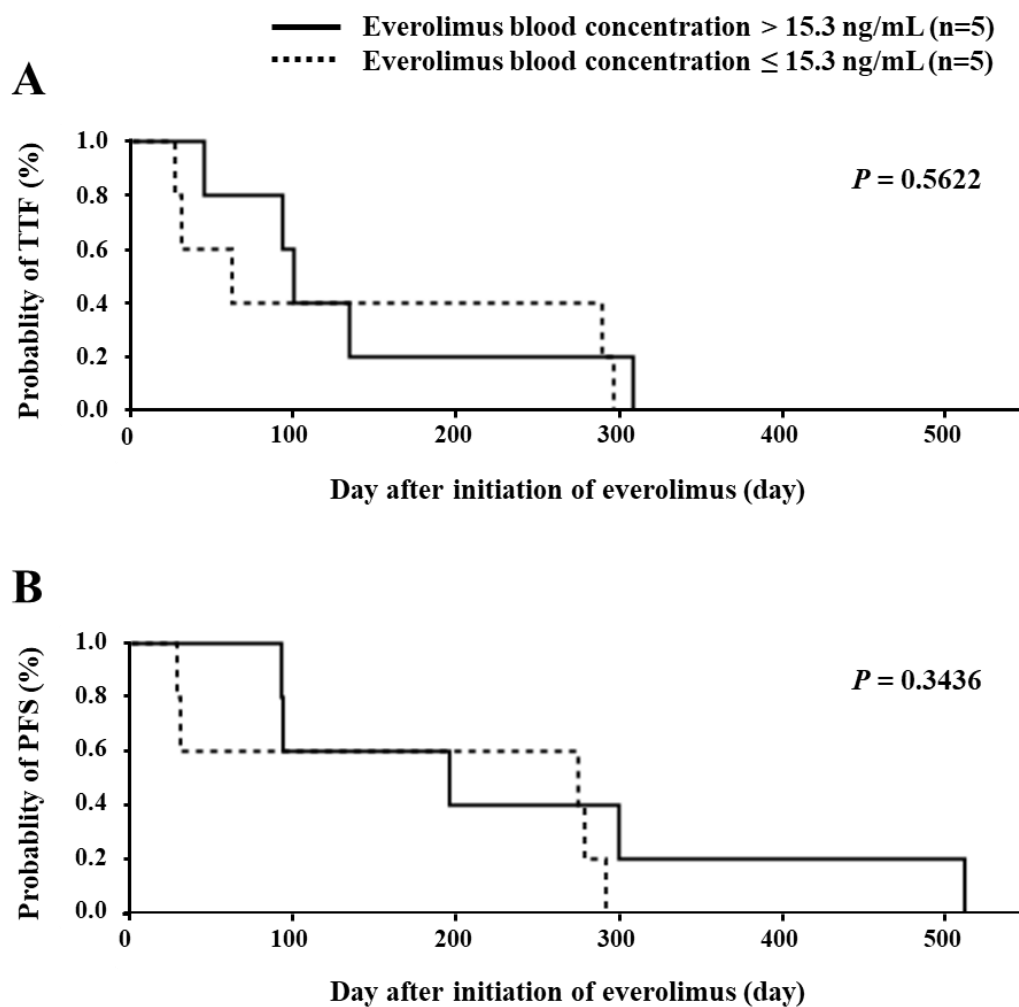


Figure 13. The relationships between everolimus blood concentration and efficacy. Efficacy was evaluated as time to treatment failure (TTF) (A) and progression-free survival (PFS) (B) with the Kaplan-Meier method and the log-rank test

## 第5節 考察

本章では、エベロリムスが投与された症例を用いた血中濃度情報の有用性、さらに PK/PD 解析について示した。第1章のパゾパニブの場合と同様に、血中濃度の定期的なモニタリングは、薬物相互作用の早期発見に有用であると考えられる。

有害事象が原因で減量または休薬した患者の方が、用量を変えずに治療継続できた患者よりも、血中エベロリムス濃度は有意に高値を示した (Table 9)。エベロリムスをがん治療目的で投与するときの中毒域は 23.6 ng/mL 以上との報告があるが[65]、上衣下巨細胞性星細胞腫の治療では 5~15 ng/mL に管理されている[58,63,64]。本研究では、血中エベロリムス濃度が 16.4 ng/mL よりも高値を示した患者 (Pat. 2, 4, 7, 9, 10) において有害事象によるエベロリムスの減量または休薬を認めたが (Table 11)、上衣下巨細胞性星細胞腫の治療域を考えると、妥当な結果であると考えられた。一方、Pat. 3 は血中エベロリムス濃度が 13.1 ng/mL であつたにも関わらず、グレード3以上の肺炎が発現した。その後、Pat. 3 は間質性肺炎と診断され、ステロイドパルス療法が行われた。エベロリムスによる間質性肺炎を引き起こす血中濃度域は、他の有害事象を引き起こす濃度よりも低い可能性があり、今後、患者数を増やした検討が必要である。

Ravaud らや Deppenweiler らが、血中エベロリムス濃度と抗腫瘍効果との関連について報告しているが[66,76]、本研究では血中濃度と有効性の関連は確認できなかった (Figure 13)。この理由として、本研究では、Ravaud らの第Ⅱ相及び第Ⅲ相臨床試験の報告[66]と比べ、PS が悪い患者や、前治療が多い患者が含まれており、エベロリムスの抗腫瘍効果が十分に期待できない患者が含まれていた可能性が考えられる。また、Deppenweiler らの研究対象は[65]乳癌患者が主で (n=42, 77.8%) 腎癌患者は少なく (n=10, 18.5%)、がん種の違いも影響

したことも考えられる。さらに、薬効評価を行うには本研究の症例数は少なかった可能性もある。

本研究における血中エベロリムス濃度は、投与 8 日目が 15.3 ng/mL、減量または投与終了直前が 14.8 ng/mL であり、これまで報告されている 15.99 ng/mL[67]や 15.65 ng/mL[66]と同等であった。また、投与 8 日目と減量または投与終了直前で、有意な差はなかった。しかし、血中エベロリムス濃度が Pat. 4 (21.8 → 58.4 ng/mL) と Pat. 9 (28.0 → 35.4 ng/mL) では大きく上昇し、両患者とも重大な有害事象により減量が行われた。個体間変動についても、大きな変動が認められた (Table 9 及び Figure 12)。個体内変動と同じように、併用薬や食事が個体間変動に影響を及ぼしていると考えられる[63]。なお、エベロリムスの薬物動態に関連する薬物代謝酵素やトランスポーターの遺伝子多型による影響に関する臨床的エビデンスは少ない[63]。最近では、CYP3A5 の遺伝子多型がトラフ濃度の上昇に関係するとの報告もあり[78]、今後、遺伝子多型についても検討が必要である。

研究の限界として、本研究の対象患者は少数であること、単一の施設であること、観察期間が短いことが挙げられる。また、第 1 章と同様に本研究も前向き観察研究であり、血中薬物濃度情報により用量変更が行われた可能性も考えらえる。今回、薬効と血中濃度との関連性については、十分に評価できていなかった可能性があることから、今後患者数を増やして検証する必要がある。

## 結論

本研究では、腎癌に対する分子標的抗がん薬である TKI と mTORi の血中濃度情報を用いた個別化医療に向けた研究を行った。

本研究で構築した LC-MS/MS を用いる TKI の一斉測定法は、実臨床での TDM を想定すると、非常に有用な測定法である。インソース CID を用いた本法を基にすれば、腎癌で使われる以外の TKI など、他の多くの薬物の一斉測定も可能であり、今後、臨床現場で広く応用できると考えられる。

今回得られた結果は、有害事象や薬物相互作用の早期発見の観点から、継続して血中濃度情報をモニターすることの重要性を示している。また、がん薬物療法においては、抗がん薬による有害事象や病勢進行に対して支持療法が行われることが多い。エベロリムス症例のように支持療法で使用する薬物についても、薬物相互作用を引き起こすこともあり、追加する薬物に細心の注意を払う必要がある。

TKI ではスニチニブの、mTORi ではエベロリムスの血中濃度情報をもとに、治療効果や有害事象との関連を精査した。個体間及び個体内変動は両薬物共に認められ、血中濃度を予測できるパラメータは確認できなかったことから、実際に患者個別に血中薬物濃度を測定することが重要であると考えられる。血中薬物濃度と有害事象との関連性は両薬物共に認められたことから、血中薬物濃度情報は減量や休薬に至るような重篤な有害事象の早期発見に有用であると考えられた。有効性は両薬物共に最小有効濃度を明確に確認できなかったが、日本人におけるスニチニブの有効血中濃度がこれまでの報告よりも低い濃度域にある可能性を見出した。これは、薬物に対する感受性が人種間で異なる可能性を示唆しており、今後、他の薬物における PK/PD 解析においても極めて重要な情報である。今回の研

究の特徴として、長期的に血中薬物濃度をモニタリングした。これにより、個体内変動や減量後の血中薬物濃度情報を確認できただけでなく、薬物相互作用の発見にも有効であった。また、すでに当院泌尿器科では、今回の研究結果に基づき、血中濃度を管理しながらスニチニブ治療を展開している。

以上の研究結果から、腎癌分子標的抗がん薬の血中薬物濃度情報は、有害事象の早期発見や薬物相互作用の確認に有用であることが示された。よって、血中濃度の定期的なモニタリングを行うことで、高濃度による有害事象の発現や、低濃度による治療効果不足を防ぐことができ、その治療効果を最大限引き出せると考えられる。また、実臨床における日本人の血中薬物濃度情報は限られているため、本研究結果はがん化学療法の個別化医療において極めて重要である。

## 実験の部

### 試薬

ソラフェニブ、ソラフェニブ *N*-オキシド、スニチニブ、*N*-デスエチルスニチニブ、イマチニブ-<sup>2</sup>H<sub>8</sub>、エベロリムス、及びエベロリムス-<sup>2</sup>H<sub>4</sub> は Toronto Research (Toronto, ON, Canada) から、アキシチニブは Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) から、パゾパニブは Synkinase (Melbourne, VIC, Australia) から購入した。HPLC 品質のアセトニトリル、メタノール、ギ酸、硫酸亜鉛、ギ酸アンモニウム、ジメチルスルホキシド及びクロトリマゾールは富士フイルム和光純薬 (Osaka, Japan) から購入した。超純水は PURELAB Ultra Genetic system (Organo, Tokyo, Japan) を用いて精製した。ヘパリン処理された個体別ヒト血漿は、コスモ・バイオ (Tokyo, Japan) より購入した。

### 標準溶液の調製

各標準化合物を精秤後、ソラフェニブは 1 mg/mL、ソラフェニブ *N*-オキシドは 100 µg/mL、スニチニブ、*N*-デスエチルスニチニブ及びアキシチニブはそれぞれ 10 µg/mL となるようアセトニトリルで溶解し、パゾパニブは 10 mg/mL となるようジメチルスルホキシドで溶解して、標準溶液を作成した。イマチニブ-<sup>2</sup>H<sub>8</sub> は精秤後、100 ng/mL となるようアセトニトリルにて溶解して、IS 溶液とした。調製した溶液は、-80°C で遮光下にて保存した。

### 装置

第 1 章では、イオン化部として ESI プローブを装着した 3 連四重極型質量分析計 LCMS-8050 (Shimadzu, Kyoto, Japan) に、高速液体クロマトグラフとして Nexera X2 UHPLC

(Shimadzu, Kyoto, Japan) を接続した装置を使用し、陽イオン検出モードで分析した。プローブ電圧を 4,000 V、DL 温度を 100°C、ブロックヒーター温度を 150°C、インターフェイス温度を 400°C、ネブライザーガス流量を 2 L/min、ドライガス流量を 3 L/min、ヒーティングガス流量を 17 L/min に設定した。

第 2 章では、イオン化部として ESI プローブを装着した 3 連四重極型質量分析計 LCMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan) に、高速液体クロマトグラフとして Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) を接続した装置を使用し、陽イオン検出モードで分析した。プローブ電圧を 4,500 V、DL 温度を 250°C、ブロックヒーター温度を 400°C、インターフェイス温度を 450°C、ネブライザーガス流量を 2.5 L/min、ドライガス流量を 7 L/min、ヒーティングガス流量を 15 L/min に設定した。

## 検体

本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会にて承認され、被験者に本研究について説明し文書にて同意を得て行った(承認番号:2010-481-1、2011-385、2011-634、2012-1-444、2014-1-150、2015-1-866)。ソラフェニブ、スニチニブ、アキシチニブあるいはパゾパニブ投与患者検体は、定常状態での投与直前の血液をヘパリン採血管にて収集し、1,580×g で 10 分間遠心分離したのち、血漿サンプルを-40°Cで保管し、測定に用いた。エベロリムス投与患者検体は、エチレンジアミン四酢酸採血管にて収集し、全血を測定に用いた。

## 第 1 章 付属実験

### 検量線試料及び QC 試料の調製



検量線試料及び QC 試料は、標準溶液をヒト血漿により混合希釈し調製した。検量線試料について、ソラフェニブは 100、500、1,000、2,000、5,000、10,000 ng/mL、ソラフェニブ *N*-オキシドは 10、50、100、200、500、1,000 ng/mL、スニチニブ、*N*-デスエチルスニチニブ及びアキシチニブは 1、5、10、20、50、100 ng/mL、パゾパニブは 500、2,500、5,000、10,000、25,000、50,000 ng/mL となるよう調製した。QC 試料について、ソラフェニブは 200、4,000、8,000 ng/mL、ソラフェニブ *N*-オキシドは 20、400、800 ng/mL、スニチニブ、*N*-デスエチルスニチニブ及びアキシチニブは 2、40、80 ng/mL、パゾパニブは 1,000、20,000、40,000 ng/mL となるよう調製した。

#### 直線性と定量下限

検量線は内標準法により、 $1/x^2$  で重み付けした最小二乗法により作成した。直線性の基準は、逆回帰値の真度 $\pm 15\%$ （LLOQ では真度 $\pm 20\%$ ）以内である濃度範囲を直線範囲とした（ $n=6$ ）。定量下限は、S/N 比が 10 以上で直線範囲の最も低い濃度とした。

#### 選択性

分析対象物及び IS を含まない 6 個体のヒト血漿を用いて、LLOQ と IS を分析することにより、選択性を確認した。

#### 分析法バリデーション

本測定法について、分析法バリデーションを実施した[79]。いずれの薬物も相関係数 0.998-0.999 の良好な直線性を示した。日内再現性は、各濃度につき同一日に 6 本ずつ QC

試料を調製して分析して得られた結果を解析し、また日間再現性は、各濃度の QC 試料につき 1 日に 1 本ずつ調製し、これを 6 日間にわたって同じことを繰り返して分析して得られた結果を解析して評価した。なお、真度及び精度については、以下の式を用いて算出した。

$$\text{式：真度 (\%)} = \text{QC 試料の測定値} / \text{理論値} \times 100$$

$$\text{精度 (\%)} = \text{QC 試料の測定値の標準偏差} / \text{QC 試料の測定値の平均} \times 100$$

その結果、日内再現性は各薬物の真度が 93.9～111.8%及び精度が 0.8～9.3%であり、日間再現性は真度が 88.3～107.7%及び精度が 1.6～10.3%であり、いずれも良好な再現性を示した (Table 13)。

次に、マトリックス効果、回収率、及び全回収率について検討した (n=3)。各 QC 試料に相当する濃度の試料を調製して検討した。すなわち、水に、標準溶液、IS 溶液及びアセトニトリルを加えて攪拌し、遠心した後の上清をサンプル A とし、ヒト血漿に、アセトニトリルを加えて攪拌し、遠心後の上清に IS 溶液及び標準溶液を加えたものをサンプル B とし、ヒト血漿に標準溶液及び IS 溶液を加えて攪拌し、遠心後の上清をサンプル C とし、以下のパラメータを算出した (n=3)。

$$\text{式：マトリックス効果 (\%)} = \text{サンプル B のピーク面積} / \text{サンプル A のピーク面積} \times 100$$

$$\text{回収率 (\%)} = \text{サンプル C のピーク面積} / \text{サンプル B のピーク面積} \times 100$$

$$\text{全回収率 (\%)} = \text{サンプル C のピーク面積} / \text{サンプル A のピーク面積} \times 100$$

その結果、いずれの薬物もマトリックス効果は 15%未満の影響であり、また良好に回収できた (Table 14)。

次いで、ヒト血漿中における各化合物の安定性につき、5°Cで 24 時間、-40°Cで 3 ヶ月、3 回繰り返し凍結融解 (-40°Cから 25°C) の各条件で調べたところ (n=3)、いずれの化合

物も残存率（残存率[%]=保存後の QC サンプルの測定値／QC サンプルの初期値×100）は 87.7%以上であり、今回の条件では顕著な分解は見られなかった（Table 15）。以上の結果から、本法の信頼性が確認された。

**Table 13. Assay performance for TKIs and metabolites from four quality controls in six runs**

Concentration (ng/mL)	Intra-day precision (%)	Intra-day accuracy (%)	Inter-day precision (%)	Inter-day accuracy (%)
Sorafenib				
LLOQ	7.7	104.6	8.9	102.6
QC low	6.1	101.6	5.3	104.3
QC medium	1.5	111.6	9.6	102.6
QC high	2.4	111.8	6.2	106.7
Sorafenib <i>N</i> -oxide				
LLOQ	9.3	103.1	7.7	103.2
QC low	6.9	102.1	6.8	98.6
QC medium	7.9	105.4	8.2	100.9
QC high	2.6	111.3	7.7	102.0
Sunitinib				
LLOQ	4.3	99.4	5.7	101.0
QC low	2.7	97.8	6.1	103.5
QC medium	1.9	98.5	6.8	100.3
QC high	0.8	99.4	8.1	100.4
<i>N</i> -Desethyl sunitinib				
LLOQ	4.0	98.4	6.6	98.7
QC low	9.0	97.2	7.9	100.3
QC medium	5.0	93.0	6.5	100.8
QC high	1.3	95.0	5.8	101.6
Axitinib				
LLOQ	6.5	100.0	6.5	99.0
QC low	7.2	104.2	7.3	107.0
QC medium	6.3	107.1	10.3	100.8
QC high	1.9	110.3	6.3	101.0
Pazopanib				
LLOQ	7.9	93.9	1.6	88.3
QC low	8.8	96.8	5.8	105.5
QC medium	3.7	104.4	5.2	107.7
QC high	2.5	100.0	8.9	100.2

**Table 14. Matrix effect, extraction recovery, and overall recovery of TKIs and metabolites from three quality controls**

Condition	Sorafenib	Sorafenib <i>N</i> -oxide	Sunitinib	<i>N</i> -Desethyl sunitinib	Axitinib	Pazopanib
Matrix effect						
QC low	87.8	100.9	108.4	114.8	112.2	97.2
QC medium	102.6	94.4	102.4	108.9	100.5	93.8
QC high	93.5	87.7	103.2	106.7	94.9	102.3
Extraction recovery						
QC low	109.5	105.2	96.7	92.7	100.0	90.3
QC medium	107.7	101.3	105.2	90.3	85.2	91.4
QC high	103.6	112.4	96.1	85.7	91.4	86.4
Overall recovery						
QC low	96.1	106.1	104.7	106.4	112.2	87.7
QC medium	110.5	95.7	107.5	98.3	85.6	85.8
QC high	96.8	98.6	99.1	91.4	86.8	88.4

**Table 15. Stability of TKIs and metabolites from three quality controls**

Condition	Sorafenib	Sorafenib <i>N</i> -oxide	Sunitinib	<i>N</i> -Desethyl sunitinib	Axitinib	Pazopanib
24 h at 25 °C						
QC low	108.9	98.8	98.5	111.2	107.6	93.7
QC medium	113.2	95.9	95.8	96.3	101.9	96.1
QC high	114.7	104.1	98.6	99.1	104.1	102.7
−40 °C at 3 months						
QC low	103.9	88.9	87.7	100.2	100.4	96.9
QC medium	91.6	89.7	93.6	102.5	109.2	94.0
QC high	89.4	102.2	94.2	110.9	114.6	114.2
3 freeze-thaw cycles						
QC low	103.3	105.2	105.0	107.7	108.4	99.5
QC medium	102.9	96.1	97.1	100.3	96.8	91.1
QC high	95.4	97.8	97.5	98.2	99.7	95.2

## 腎癌患者検体の測定

本測定法 (present method) と、これまでに報告されている測定法 (reference method) について、腎癌患者検体を用いて比較した。

ソラフェニブ及びソラフェニブ *N*-オキシドは Shimada らの方法[80]に準じた。高速液体クロマトグラフには、ポンプ、オートサンプラー、検出器が一体となった Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)を用い、分析カラムには Inertsil ODS-3 (150 mm×2.1 mm i.d., 5 µm, GL sciences, Tokyo)を、トラップカラムには EXP C18 (10 mm×4.0 mm i.d., 3 µm, GL Sciences, Tokyo)を用いた。分析用移動相として水／メタノール (3:7, v/v)、トラップ用移動相として水／アセトニトリル (9:1, v/v) を用いて、流速は 200 µL/min に設定し、UV 波長は 265 nm で検出した。IS にはクロトリマゾールを用いた。血漿 50 µL に IS を 100 µg/mL 含むアセトニトリル溶液 50 µL を加え、攪拌した後、1,500×g で 5 分間遠心して、その上清 30 µL を注入した。

スニチニブ、*N*-デスエチルスニチニブ及びアキシチニブは、Rodamer らの報告[81]を基に分析した。質量分析計は LCMS-8050 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 、高速液体クロマトグラフは Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) 、分析カラムは Inertsil ODS-3 (100 mm×2.1 mm i.d., 2 µm, GL sciences, Tokyo)を使用した。分析用移動相は 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルを使用し、陽イオンモードにて検出した。IS はイマチニブ-<sup>2</sup>H<sub>8</sub>を用いた。血漿 50 µL に IS を 100 ng/mL 含むアセトニトリル溶液 100 µL とアセトニトリル 100 µL を加えて攪拌した後、1,500 ×g で 5 分間遠心して、その上清を 10 mM ギ酸アンモニウムで 2 倍に希釈して、1 µL を注入サンプルとした。定量範囲は、スニチニブが 3～300 ng/mL、*N*-デスエチルスニチニブが 3～300 ng/mL、アキシチニブが 0.3～30 ng/mL であった。

パゾパニブは、血漿 50  $\mu$ L に IS を 100 ng/mL 含むアセトニトリル溶液 50  $\mu$ L と 400  $\mu$ L のアセトニトリルを加えて攪拌した後、1,500 $\times$ g で 5 分間遠心して、その上清を 10 mM ギ酸アンモニウムで 10 倍に希釈して、1  $\mu$ L を注入サンプルとした。他の条件は、上記のスニチニブ、*N*-デスエチルスニチニブ及びアキシチニブの分析法と同様とした。定量範囲は、500～50,000 ng/mL であった。

それぞれの薬物を服用している患者 2 名ずつの血中濃度を測定したが、いずれの検体も本法の定量範囲内であり、present method で測定した値と reference method で測定した値を比べると、97～108%と同等な結果であった (Table 16)。

**Table 16. Trough concentration of TKIs and metabolites in each patient**

Patient	Sex	Age	Body weight	Compound	Dose	Analyte	Concentration (ng/mL)	Concentration (ng/mL)
number		(years)	(kg)		(mg/day)		by the present method	by the reference method
1	Male	77	44.6	Sorafenib	400	Sorafenib	4,760	4,420
						Sorafenib <i>N</i> -oxide	188	192
2	Male	65	63.9	Sorafenib	800	Sorafenib	8,240	7,620
						Sorafenib <i>N</i> -oxide	342	350
3	Male	84	56.4	Sunitinib	25	Sunitinib	19.9	20.5
						<i>N</i> -Desethyl sunitinib	17.5	18.0
4	Female	62	72.6	Sunitinib	37.5	Sunitinib	44.8	46.2
						<i>N</i> -Desethyl sunitinib	13.9	14.3
5	Male	72	49.4	Axitinib	6	Axitinib	5.71	5.36
6	Male	63	49.3	Axitinib	10	Axitinib	4.56	4.55
7	Male	68	58.0	Pazopanib	400	Pazopanib	16,600	15,600
8	Male	81	64.5	Pazopanib	400	Pazopanib	32,300	30,400



## 引用文献

1. R. J. Motzer, E. Jonasch, N. Agarwal, S. Bhayani, W. P. Bro, S. S. Chang, T. K. Choueiri, B. A. Costello, I. H. Derweesh, M. Fishman, T. H. Gallagher, J. L. Gore, S. L. Hancock, M. R. Harrison, W. Kim, C. Kyriakopoulos, C. LaGrange, E. T. Lam, C. Lau, M. D. Michaelson, T. Olencki, P. M. Pierorazio, E. R. Plimack, B. G. Redman, B. Shuch, B. Somer, G. Sonpavde, J. Sosman, M. Dwyer, and R. Kumar. Kidney cancer, version 2.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2017;15(6):804-834.
2. 日本泌尿器科学会. 腎癌診療ガイドライン 2017 年版. 2017.  
[https://www.urol.or.jp/lib/files/other/guideline/33\\_renal\\_cancer\\_2017\\_rev2019.pdf](https://www.urol.or.jp/lib/files/other/guideline/33_renal_cancer_2017_rev2019.pdf)
3. B. I. Rini, S. C. Campbell, and B. Escudier. Renal cell carcinoma. *Lancet*. 2009;373(9669):1119-1132.
4. K. Yoshimura and H. Uemura. Pharmacotherapies for renal cell carcinoma in Japan. *International Journal of Urology*. 2016;23(3):194-202.
5. N. Widmer, C. Bardin, E. Chatelut, A. Paci, J. Beijnen, D. Leveque, G. Veal, and A. Astier. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two--targeted therapies. *European Journal of Cancer*. 2014;50(12):2020-2036.
6. A. Paci, G. Veal, C. Bardin, D. Leveque, N. Widmer, J. Beijnen, A. Astier, and E. Chatelut. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1--cytotoxics. *European Journal of Cancer*. 2014;50(12):2010-2019.
7. B. Gao, S. Yeap, A. Clements, B. Balakrishnar, M. Wong, and H. Gurney. Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(32):4017-4025.
8. R. A. Larson, B. J. Druker, F. Guilhot, S. G. O'Brien, G. J. Riviere, T. Krahne, I. Gathmann, and Y. Wang. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*. 2008;111(8):4022-4028.
9. Y. Ishikawa, H. Kiyoi, K. Watanabe, K. Miyamura, Y. Nakano, K. Kitamura, A. Kohno, I. Sugiura, T. Yokozawa, A. Hanamura, K. Yamamoto, H. Iida, N. Emi, R. Suzuki, K. Ohnishi, and T. Naoe. Trough plasma concentration of imatinib reflects BCR-ABL kinase inhibitory

- activity and clinical response in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a report from the BINGO study. *Cancer Science*. 2010;101(10):2186-2192.
10. N. Takahashi, H. Wakita, M. Miura, S. A. Scott, K. Nishii, M. Masuko, M. Sakai, Y. Maeda, K. Ishige, M. Kashimura, K. Fujikawa, M. Fukazawa, T. Katayama, F. Monma, M. Narita, F. Urase, T. Furukawa, Y. Miyazaki, N. Katayama, and K. Sawada. Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2010;88(6):809-813.
  11. F. Guilhot, T. P. Hughes, J. Cortes, B. J. Druker, M. Baccarani, I. Gathmann, M. Hayes, C. Granvil, and Y. Wang. Plasma exposure of imatinib and its correlation with clinical response in the Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity Trial. *Haematologica*. 2012;97(5):731-738.
  12. B. Escudier, T. Eisen, W. M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A. A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T. E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov, and R. M. Bukowski. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(2):125-134.
  13. R. J. Motzer, T. E. Hutson, P. Tomczak, M. D. Michaelson, R. M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S. T. Kim, I. Chen, P. W. Bycott, C. M. Baum, and R. A. Figlin. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(2):115-124.
  14. B. I. Rini, B. Escudier, P. Tomczak, A. Kaprin, C. Szczylik, T. E. Hutson, M. D. Michaelson, V. A. Gorbunova, M. E. Gore, I. G. Rusakov, S. Negrier, Y. C. Ou, D. Castellano, H. Y. Lim, H. Uemura, J. Tarazi, D. Cella, C. Chen, B. Rosbrook, S. Kim, and R. J. Motzer. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2011;378(9807):1931-1939.
  15. R. J. Motzer, T. E. Hutson, D. Cella, J. Reeves, R. Hawkins, J. Guo, P. Nathan, M. Staehler, P. de Souza, J. R. Merchan, E. Boleti, K. Fife, J. Jin, R. Jones, H. Uemura, U. De Giorgi, U. Harmenberg, J. Wang, C. N. Sternberg, K. Deen, L. McCann, M. D. Hackshaw, R. Crescenzo, L. N. Pandite, and T. K. Choueiri. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(8):722-731.
  16. R. J. Motzer, B. Escudier, S. Oudard, T. E. Hutson, C. Porta, S. Bracarda, V. Grunwald, J. A.

- Thompson, R. A. Figlin, N. Hollaender, G. Urbanowitz, W. J. Berg, A. Kay, D. Lebwohl, and A. Ravaud. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008;372(9637):449-456.
17. G. Hudes, M. Carducci, P. Tomczak, J. Dutcher, R. Figlin, A. Kapoor, E. Staroslawska, J. Sosman, D. McDermott, I. Bodrogi, Z. Kovacevic, V. Lesovoy, I. G. H. Schmidt-Wolf, O. Barbarash, E. Gokmen, T. O'Toole, S. Lustgarten, L. Moore, and R. J. Motzer. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(22):2271-2281.
  18. S. Faivre, C. Delbaldo, K. Vera, C. Robert, S. Lozahic, N. Lassau, C. Bello, S. Deprimo, N. Brega, G. Massimini, J. P. Armand, P. Scigalla, and E. Raymond. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(1):25-35.
  19. T. Ohzeki, S. Fukasawa, A. Komaru, T. Namekawa, Y. Sato, K. Takagi, M. Kobayashi, H. Uemura, T. Ichikawa, and T. Ueda. Efficacy of traditional and alternative sunitinib treatment schedules in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma. *International Journal of Urology*. 2014;21(10):1065-1068.
  20. Y. G. Najjar, K. Mittal, P. Elson, L. Wood, J. A. Garcia, R. Dreicer, and B. I. Rini. A 2 weeks on and 1 week off schedule of sunitinib is associated with decreased toxicity in metastatic renal cell carcinoma. *European Journal of Cancer*. 2014;50(6):1084-1089.
  21. T. Kondo, T. Takagi, H. Kobayashi, J. Iizuka, T. Nozaki, Y. Hashimoto, E. Ikezawa, K. Yoshida, K. Omae, and K. Tanabe. Superior tolerability of altered dosing schedule of sunitinib with 2-weeks-on and 1-week-off in patients with metastatic renal cell carcinoma--comparison to standard dosing schedule of 4-weeks-on and 2-weeks-off. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2014;44(3):270-277.
  22. B. J. Atkinson, S. Kalra, X. Wang, T. Bathala, P. Corn, N. M. Tannir, and E. Jonasch. Clinical outcomes for patients with metastatic renal cell carcinoma treated with alternative sunitinib schedules. *Journal of Urology*. 2014;191(3):611-618.
  23. F. Da Silva, A. Thomas-Schoemann, O. Huillard, F. Goldwasser, and B. Blanchet. Benefit of therapeutic drug monitoring to disclose pharmacokinetic interaction between sunitinib and calcium channel blocker. *Annals of Oncology*. 2016;27(8):1651-1652.

24. S. Noda, T. Otsuji, M. Baba, T. Yoshida, S. Kageyama, K. Okamoto, Y. Okada, A. Kawauchi, H. Onishi, D. Hira, S. Y. Morita, and T. Terada. Assessment of sunitinib-induced toxicities and clinical outcomes based on therapeutic drug monitoring of sunitinib for patients with renal cell carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer*. 2015;13(4):350-358.
25. V. R. Adams and M. Leggas. Sunitinib malate for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors. *Clinical Therapeutics*. 2007;29(7):1338-1353.
26. V. L. Goodman, E. P. Rock, R. Dagher, R. P. Ramchandani, S. Abraham, J. V. Gobburu, B. P. Booth, S. L. Verbois, D. E. Morse, C. Y. Liang, N. Chidambaram, J. X. Jiang, S. Tang, K. Mahjoob, R. Justice, and R. Pazdur. Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(5):1367-1373.
27. M. Fukudo, T. Ito, T. Mizuno, K. Shinsako, E. Hatano, S. Uemoto, T. Kamba, T. Yamasaki, O. Ogawa, H. Seno, T. Chiba, and K. Matsubara. Exposure-toxicity relationship of sorafenib in Japanese patients with renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014;53(2):185-196.
28. H. Kato, N. Sassa, M. Miyazaki, M. Takeuchi, M. Asai, A. Iwai, Y. Noda, M. Gotoh, and K. Yamada. Association of axitinib plasma exposure and genetic polymorphisms of ABC transporters with axitinib-induced toxicities in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2016;78(4):855-862.
29. S. Noda, T. Yoshida, D. Hira, R. Murai, K. Tomita, T. Tsuru, S. Kageyama, A. Kawauchi, Y. Ikeda, S. Y. Morita, and T. Terada. Exploratory investigation of target pazopanib concentration range for patients with renal cell carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer*. 2019;17(2):e306-e313.
30. B. E. Houk, C. L. Bello, B. Poland, L. S. Rosen, G. D. Demetri, and R. J. Motzer. Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2010;66(2):357-371.
31. D. B. Mendel, A. D. Laird, X. Xin, S. G. Louie, J. G. Christensen, G. Li, R. E. Schreck, T. J. Abrams, T. J. Ngai, L. B. Lee, L. J. Murray, J. Carver, E. Chan, K. G. Moss, J. O. Haznedar,

- J. Sukbuntherng, R. A. Blake, L. Sun, C. Tang, T. Miller, S. Shirazian, G. McMahon, and J. M. Cherrington. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical Cancer Research*. 2003;9(1):327-337.
32. C. Narjoz, A. Cessot, A. Thomas-Schoemann, J. L. Golmard, O. Huillard, P. Boudou-Rouquette, A. Behouche, F. Taieb, J. P. Durand, A. Dauphin, R. Coriat, M. Vidal, M. Tod, J. Alexandre, M. A. Loriot, F. Goldwasser, and B. Blanchet. Role of the lean body mass and of pharmacogenetic variants on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of sunitinib in cancer patients. *Investigational New Drugs*. 2015;33(1):257-268.
33. D. Sabanathan, A. Zhang, P. Fox, S. Coulter, V. Gebiski, B. Balakrishnar, M. Chan, C. Liddle, and H. Gurney. Dose individualization of sunitinib in metastatic renal cell cancer: toxicity-adjusted dose or therapeutic drug monitoring. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2017;80(2):385-393.
34. H. Uemura, N. Shinohara, T. Yuasa, Y. Tomita, H. Fujimoto, M. Niwakawa, S. Mugiya, T. Miki, N. Nonomura, M. Takahashi, Y. Hasegawa, N. Agata, B. Houk, S. Naito, and H. Akaza. A phase II study of sunitinib in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma: insights into the treatment, efficacy and safety. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2010;40(3):194-202.
35. H. Akaza, S. Naito, N. Ueno, K. Aoki, H. Houzawa, S. Pitman Lowenthal, and S. Y. Lee. Real-world use of sunitinib in Japanese patients with advanced renal cell carcinoma: efficacy, safety and biomarker analyses in 1689 consecutive patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2015;45(6):576-583.
36. A. Kawashima, A. Tsujimura, H. Takayama, Y. Arai, M. Nin, G. Tanigawa, Y. Yasunaga, M. Mukai, M. Uemura, Y. Nakai, K. Nishimura, and N. Nonomura. Importance of continuing therapy and maintaining one-month relative dose intensity in sunitinib therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Medical Oncology*. 2012;29(5):3298-3305.
37. R. W. Sparidans, D. Iusuf, A. H. Schinkel, J. H. Schellens, and J. H. Beijnen. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for the light sensitive tyrosine kinase inhibitor axitinib in human plasma. *Journal of Chromatography B*.

- 2009;877(32):4090-4096.
38. S. Bouchet, E. Chauzit, D. Ducint, N. Castaing, M. Canal-Raffin, N. Moore, K. Titier, and M. Molimard. Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS-MS. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(11-12):1060-1067.
  39. I. Andriamanana, I. Gana, B. Duretz, and A. Hulin. Simultaneous analysis of anticancer agents bortezomib, imatinib, nilotinib, dasatinib, erlotinib, lapatinib, sorafenib, sunitinib and vandetanib in human plasma using LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2013;92683-91.
  40. N. A. Lankheet, M. J. Hillebrand, H. Rosing, J. H. Schellens, J. H. Beijnen, and A. D. Huitema. Method development and validation for the quantification of dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib and sunitinib in human plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2013;27(4):466-476.
  41. N. P. van Erp, D. de Wit, H. J. Guchelaar, H. Gelderblom, T. J. Hessing, and Jd Hartigh. A validated assay for the simultaneous quantification of six tyrosine kinase inhibitors and two active metabolites in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2013;93733-43.
  42. M. Shimada, H. Okawa, Y. Kondo, T. Maejima, Y. Kataoka, K. Hisamichi, M. Maekawa, M. Matsuura, Y. Jin, M. Mori, H. Suzuki, T. Shimosegawa, and N. Mano. Monitoring serum levels of sorafenib and its *N*-oxide is essential for long-term sorafenib treatment of patients with hepatocellular carcinoma. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2015;237(3):173-182.
  43. A. B. Suttle, H. A. Ball, M. Molimard, T. E. Hutson, C. Carpenter, D. Rajagopalan, Y. Lin, S. Swann, R. Amado, and L. Pandite. Relationships between pazopanib exposure and clinical safety and efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2014;111(10):1909-1916.
  44. N. Matsunaga, T. Kitahara, M. Yamada, K. Sato, Y. Kodama, and H. Sasaki. The influence of light sources on sunitinib measurements with photoisomerization. *Biomedical Chromatography*. 2019;33(2):e4407.

45. H. Ishii, M. Shimada, H. Yamaguchi, and N. Mano. A simultaneous determination method for 5-fluorouracil and its metabolites in human plasma with linear range adjusted by in-source collision-induced dissociation using hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2016;30(11):1882-1886.
46. H. Ishii, H. Yamaguchi, and N. Mano. Shifting the linear range in electrospray ionization by in-source collision-induced dissociation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2016;64(4):356-359.
47. H. Ishii, H. Yamaguchi, and N. Mano. Expanding the versatility of a quantitative determination range adjustment technique using in-source CID in LC/MS/MS. *Chromatography*. 2017;3859-63.
48. R. Khosravan, M. Toh, M. Garrett, J. La Fargue, G. Ni, T. C. Marbury, S. K. Swan, N. M. Lunde, and C. L. Bello. Pharmacokinetics and safety of sunitinib malate in subjects with impaired renal function. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2010;50(4):472-481.
49. H. Izzedine, M. C. Etienne-Grimaldi, N. Renee, S. Vignot, and G. Milano. Pharmacokinetics of sunitinib in hemodialysis. *Annals of Oncology*. 2009;20(1):190-192.
50. S. Noda, S. Kageyama, T. Tsuru, S. Kubota, T. Yoshida, K. Okamoto, Y. Okada, S. Y. Morita, and T. Terada. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of a hemodialyzed patient treated with 25 mg of sunitinib. *Case Reports in Oncology*. 2012;5(3):627-632.
51. B. C. Goh, N. J. Reddy, U. B. Dandamudi, K. H. Laubscher, T. Peckham, J. P. Hodge, A. B. Suttle, T. Arumugham, Y. Xu, C. F. Xu, J. Lager, M. M. Dar, and L. D. Lewis. An evaluation of the drug interaction potential of pazopanib, an oral vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, using a modified Cooperstown 5+1 cocktail in patients with advanced solid tumors. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2010;88(5):652-659.
52. T. Lisman and F. W. Leebeek. Hemostatic alterations in liver disease: a review on pathophysiology, clinical consequences, and treatment. *Digestive Surgery*. 2007;24(4):250-258.
53. L. Cabel, B. Blanchet, A. Thomas-Schoemann, O. Huillard, A. Bellesoeur, A. Cessot, J. Giroux, P. Boudou-Rouquette, R. Coriat, M. Vidal, N. E. B. Saidu, L. Golmard, J.

- Alexandre, and F. Goldwasser. Drug monitoring of sunitinib in patients with advanced solid tumors: a monocentric observational French study. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2017.
54. T. Mizuno, M. Fukudo, T. Terada, T. Kamba, E. Nakamura, O. Ogawa, K. Inui, and T. Katsura. Impact of genetic variation in breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) on sunitinib pharmacokinetics. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2012;27(6):631-639.
  55. M. Miura. Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2015;38(5):645-654.
  56. M. H. Diekstra, J. J. Swen, E. Boven, D. Castellano, H. Gelderblom, R. H. Mathijssen, C. Rodriguez-Antona, J. Garcia-Donas, B. I. Rini, and H. J. Guchelaar. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms as predictors for sunitinib outcome in metastatic renal cell carcinoma. *European Urology*. 2015;68(4):621-629.
  57. J. J. Bissler, J. C. Kingswood, E. Radzikowska, B. A. Zonnenberg, M. Frost, E. Belousova, M. Sauter, N. Nonomura, S. Brakemeier, P. J. de Vries, V. H. Whittmore, D. Chen, T. Sahmoud, G. Shah, J. Lincy, D. Lebwohl, and K. Budde. Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangioleiomyomatosis (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2013;381(9869):817-824.
  58. D. N. Franz, E. Belousova, S. Sparagana, E. M. Bebin, M. Frost, R. Kuperman, O. Witt, M. H. Kohrman, J. R. Flamini, J. Y. Wu, P. Curatolo, P. J. de Vries, V. H. Whittmore, E. A. Thiele, J. P. Ford, G. Shah, H. Cauwel, D. Lebwohl, T. Sahmoud, and S. Jozwiak. Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2013;381(9861):125-132.
  59. M. E. Pavel, J. D. Hainsworth, E. Baudin, M. Peeters, D. Horsch, R. E. Winkler, J. Klimovsky, D. Lebwohl, V. Jehl, E. M. Wolin, K. Oberg, E. Van Cutsem, and J. C. Yao. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet*. 2011;378(9808):2005-2012.



60. J. Baselga, M. Campone, M. Piccart, H. A. Burris, 3rd, H. S. Rugo, T. Sahmoud, S. Noguchi, M. Gnant, K. I. Pritchard, F. Lebrun, J. T. Beck, Y. Ito, D. Yardley, I. Deleu, A. Perez, T. Bachelot, L. Vittori, Z. Xu, P. Mukhopadhyay, D. Lebwohl, and G. N. Hortobagyi. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(6):520-529.
61. H. J. Eisen, E. M. Tuzcu, R. Dorent, J. Kobashigawa, D. Mancini, H. A. Valentine-von Kaeppler, R. C. Starling, K. Sorensen, M. Hummel, J. M. Lind, K. H. Abeywickrama, and P. Bernhardt. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(9):847-858.
62. H. Tedesco Silva, Jr., D. Cibrik, T. Johnston, E. Lackova, K. Mange, C. Panis, R. Walker, Z. Wang, G. Zibari, and Y. S. Kim. Everolimus plus reduced-exposure CsA versus mycophenolic acid plus standard-exposure CsA in renal-transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2010;10(6):1401-1413.
63. M. Shipkova, D. A. Hesselink, D. W. Holt, E. M. Billaud, T. van Gelder, P. K. Kunicki, M. Brunet, K. Budde, M. J. Barten, P. De Simone, E. Wieland, O. M. Lopez, S. Masuda, C. Seger, N. Picard, M. Oellerich, L. J. Langman, P. Wallemacq, R. G. Morris, C. Thompson, and P. Marquet. Therapeutic drug monitoring of everolimus: a consensus report. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2016;38(2):143-169.
64. D. A. Krueger, M. M. Care, K. Holland, K. Agricola, C. Tudor, P. Mangeshkar, K. A. Wilson, A. Byars, T. Sahmoud, and D. N. Franz. Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(19):1801-1811.
65. M. Deppenweiler, S. Falkowski, F. Saint-Marcoux, C. Monchaud, N. Picard, M. L. Laroche, N. Tubiana-Mathieu, L. Venat-Bouvet, P. Marquet, and J. B. Woillard. Towards therapeutic drug monitoring of everolimus in cancer? Results of an exploratory study of exposure-effect relationship. *Pharmacological Research*. 2017;121:138-144.
66. A. Ravaud, S. R. Urva, K. Grosch, W. K. Cheung, O. Anak, and D. B. Sellami. Relationship between everolimus exposure and safety and efficacy: meta-analysis of clinical trials in oncology. *European Journal of Cancer*. 2014;50(3):486-495.
67. S. Noguchi, N. Shinohara, T. Ito, A. Ohtsu, A. Ravaud, G. Jerusalem, N. Ohno, J. Gallo, E.

- Bouillaud, J. Fan, and N. Nonomura. Relationship between pulmonary adverse events and everolimus exposure in Japanese and Non-Japanese patients: a meta-analysis of oncology trials. *Oncology*. 2017;92(5):243-254.
68. Louis M. McMahon, Suyi Luo, Michael Hayes, and Francis L. S. Tse. High-throughput analysis of everolimus (RAD001) and cyclosporin A (CsA) in whole blood by liquid chromatography/mass spectrometry using a semi-automated 96-well solid-phase extraction system. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2000;14(21):1965-1971.
  69. T. Koal, M. Deters, B. Casetta, and V. Kaefer. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2004;805(2):215-222.
  70. A. O'Donnell, S. Faivre, H. A. Burris, 3rd, D. Rea, V. Papadimitrakopoulou, N. Shand, H. A. Lane, K. Hazell, U. Zoellner, J. M. Kovarik, C. Brock, S. Jones, E. Raymond, and I. Judson. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(10):1588-1595.
  71. E. Spina, F. Pisani, and E. Perucca. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. An update. *Clinical Pharmacokinetics*. 1996;31(3):198-214.
  72. C. A. Stedman and M. L. Barclay. Review article: comparison of the pharmacokinetics, acid suppression and efficacy of proton pump inhibitors. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2000;14(8):963-978.
  73. P. N. Patsalos. Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000;85(2):77-85.
  74. T. Ishizaki and Y. Horai. Review Article: Cytochrome P450 and the Metabolism of Proton Pump Inhibitors--Emphasis on Rabeprazole. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 1999;13(3):27-36.
  75. S. Noda, M. Shioya, D. Hira, Y. Fujiyama, SY. Morita, and T. Terada. Pharmacokinetic interaction between sorafenib and prednisolone in a patient with hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2013;72(1):269-272.
  76. G. I. Kirchner, I. Meier-Wiedenbach, and M. P. Manns. Clinical pharmacokinetics of

- everolimus. *Clinical Pharmacokinetics*. 2004;43(2):83-95.
77. S. Takasaki, M. Kikuchi, Y. Kawasaki, A. Ito, Y. Arai, H. Yamaguchi, and N. Mano. A case of renal cell carcinoma with high everolimus blood concentrations and hyperglycemia due to everolimus-induced hepatic dysfunction [Japanese]. *Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy*. 2017;44(1):87-89.
78. S. Bonnet, S. Falkowski, M. Deppenweiler, C. Monchaud, H. Arnion, N. Picard, JB. Woillard. Effect of genetic polymorphisms in CYP3A4, CYP3A5, and m-TOR on everolimus blood exposure and clinical outcomes in cancer patients. *The Pharmacogenomics Journal*. 2020 (Online ahead of print)
79. FDA. Guidance for industry bioanalytical method validation. 2001.  
[www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070107.pdf](http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070107.pdf)
80. M. Shimada, H. Okawa, T. Maejima, T. Yanagi, K. Hisamichi, M. Matsuura, K. Akasaka, M. Tsuchiya, Y. Kondo, T. Shimosegawa, M. Mori, M. Maekawa, H. Suzuki, and N. Mano. A quantitative HPLC-UV method for determination of serum sorafenib and sorafenib *N*-oxide and its application in hepatocarcinoma patients. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2014;233(2):103-112.
81. M. Rodamer, P. W. Elsinghorst, M. Kinzig, M. Gutschow, and F. Sorgel. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry procedure for the quantification of sunitinib (SU11248) and its active metabolite, *N*-desethyl sunitinib (SU12662), in human plasma: application to an explorative study. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(11-12):695-706.

## 謝辞

本研究に際し、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました東北大学病院薬剤部 眞野成康教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文を査読していただき、貴重な御意見と御校閲を賜りました東北大学大学院薬学研究科 がん化学療法薬学分野 富岡佳久 教授、生活習慣病治療薬学分野 平塚真弘 准教授に謹んで感謝いたします。

本研究を行う上で、懇切な御指導と御助言を頂きました山形大学医学部附属病院薬剤部 山口浩明 教授に深く感謝致します。

本研究に多大なる御協力を頂きました宮城県立がんセンター 荒井陽一 総長、東北大学大学院医学系研究科 外科病態学講座泌尿器科学分野 伊藤明宏 教授、川崎芳英 院内講師に心より御礼申し上げます。

本研究遂行にあたり、東北大学病院薬剤部 前川正充 准教授、東北大学大学院薬学研究科 医療薬学教育研究センター 菊地正史 准教授をはじめ、東北大学病院薬剤部および東北大学大学院薬学研究科 病態分子薬学分野の皆様にご心より感謝の意を表します。